

UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1933-1934

N° 9

ÉTUDE CRITIQUE DES MÉTHODES D'EXTRACTION DES TOXIQUES ORGANIQUES

APPLICATION A LA RECHERCHE DES DÉRIVÉS BARBITURIQUES

THÈSE

POUR L'OBTENTION DU DIPLÔME DE

Docteur de l'Université de Paris
(PHARMACIE)

présentée et soutenue publiquement le février 1934

PAR

Rodolfo S. LOBO

Pharmacien

Ancien Interne des Hôpitaux de Buenos-Aires
Chef de Travaux Pratiques de la Chaire de Chimie Analytique
de la Faculté des Sciences Médicales

JURY { MM. TASSILLY, *Président.*
FABRE, *Professeur.*
FLEURY, *Agrégé.*

PARIS

JOUVE & C^{ie}, ÉDITEURS

15, RUE RACINE, 15

1934

UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1933-1934

N° 9

ÉTUDE CRITIQUE DES MÉTHODES D'EXTRACTION DES TOXIQUES ORGANIQUES

APPLICATION A LA RECHERCHE DES DÉRIVÉS BARBITURIQUES

THÈSE

POUR L'OBTENTION DU DIPLÔME DE

Docteur de l'Université de Paris
(PHARMACIE)

présentée et soutenue publiquement le février 1934

PAR

Rodolfo S. LOBO

Pharmacien

Ancien Interne des Hôpitaux de Buenos-Aires
Chef de Travaux Pratiques de la Chaire de Chimie Analytique
de la Faculté des Sciences Médicales

JURY { MM. TASSILLY, *Président.*
FABRE, *Professeur.*
FLEURY, *Agrégé.*

PARIS

JOUVE & C^{ie}, ÉDITEURS

15, RUE RACINE, 15

1934

Personnel de la Faculté de Pharmacie de Paris

ADMINISTRATION

MM. GUÉRIN, *Doyen*, O. ✱, ☉ I.
LEBEAU, *Assesseur*, O. ✱, ☉ I.
P. DESPORT, *Secrétaire*, ✱, ☉ I.

PROFESSEURS

MM. GUÉRIN, ✱, ☉ I.	Botanique générale.
BÉHAL, Membre de l'Institut, G. O. ✱, ☉ I.	Chimie organique.
PERROT, O. ✱, ☉ I.	Histoire naturelle des Médicaments.
COUTIÈRE, O. ✱, ☉ I.	Zoologie.
LEBEAU, O. ✱, ☉ I.	Pharmacie chimique.
BOUGAULT, ✱, ☉ I.	Chimie analytique.
GORIS, ✱, ☉ I.	Pharmacie galénique.
TASSILLY, O. ✱, ☉ I.	Physique.
DAMIENS, ✱, ☉ I.	Chimie minérale.
HÉRISSEY, O. ✱, ☉ I.	Chimie biologique.
SOMMELET, ✱, ☉ I.	Hydrologie et Hygiène.
LUTZ, O. ✱, ☉ I.	Cryptogamie et Microbiologie.
FABRE, ✱, ☉ I.	Toxicologie.
LAUNOY, O. ✱, ☉ I.	Professeur sans chaire.

Doyen honoraire : M. RADAIS, O. ✱, ☉ I.

Professeurs honoraires : MM. DÉLÉPINE, O. ✱, ☉ I. et GUERBET, O. ✱, ☉ I.

CHARGÉS DE COURS

MM. MARC HONNORAT, ✱, ☉ I.	Législation et Déontologie pharmaceutiques.
LAUNOY, O. ✱, ☉ I.	Pharmacodynamie.
DELABY, ✱, ☉ I.	Minéralogie.
PICON, ☉ I.	Chimie minérale.
BACH, ☉ I.	Microbiologie.

AGRÉGÉS EN EXERCICE

MM. DELABY, ✱, ☉ I.	MM. MASCRÉ, ☉ I.	MM. BEDEL, ☉ I.
PICON, ☉ I.	FLEURY, ☉ I.	RÉGNIER, ☉ I.
	BACH, ☉ I.	

CHEFS DES TRAVAUX PRATIQUES

MM. BEDEL, ☉ I., agrégé chargé des T. P. de 1 ^{re} année.	Chimie générale.
FLEURY, ☉ I. et RÉGNIER, ☉ I., agrégés, chargés des travaux de	Chimie analytique.
SOUÈGES, ☉ I.	Micrographie.
LEROUX, ☉ I.	Physique.
DEVAL, ✱, ☉ I.	Microbiologie.
DELABY, ✱, ☉ I., PICON, ☉ I. et MASCRÉ, ☉ I. : agrégés, chargés des Travaux généraux de 4 ^e année.	

Bibliothécaire en Chef : M. BERNARD, ☉ I.



A M. LE PROFESSEUR RENÉ FABRE

Professeur de Toxicologie à la Faculté de Pharmacie de Paris
Pharmacien en Chef
du Groupe Hospitalier Necker-Enfants-Malades
Chevalier de la Légion d'honneur

*Hommage de profonde reconnaissance
et de respectueux attachement.*

A M. LE PROFESSEUR E. TASSILLY

Professeur de Physique à la Faculté de Pharmacie de Paris
Officier de la Légion d'honneur

A M. LE PROFESSEUR P. FLEURY

Professeur agrégé à la Faculté de Pharmacie de Paris

Hommage respectueux.

A M. LE PROFESSEUR LUIS ROSSI

Professeur de Chimie Analytique Générale et Toxicologique
à la Faculté des Sciences Médicales de Buenos-Aires

*Qui m'a toujours prodigué ses conseils
et ses encouragements ; j'adresse mes
sentiments de profonde gratitude.*

A M. AGUSTIN D. MARENZI

Professeur suppléant et Chargé de Cours de Chimie Biologique
à la Faculté des Sciences Médicales de Buenos-Aires

A M. SANTIAGO A. CELSI

Professeur suppléant et Chargé de Cours de Chimie Analytique
à la Faculté des Sciences Médicales de Buenos-Aires

*En témoignage de mon amitié
dévouée.*

A M. PAUL CHERAMY

Assistant à la Faculté de Pharmacie de Paris
Pharmacien en Chef de l'Hôpital Boucicaut

*En témoignage de ma vive gratitude
et de mon amitié dévouée.*

A M. LE PROFESSEUR BERNARDO A. HOUSSAY

Vice-Président de l'Académie Nationale de Médecine
de Buenos-Aires
Conseiller de la Faculté des Sciences Médicales
Directeur de l'Institut de Physiologie

Hommage de respectueuse reconnaissance.

ÉTUDE CRITIQUE DES MÉTHODES D'EXTRACTION DES TOXIQUES ORGANIQUES

APPLICATION A LA RECHERCHE DES DÉRIVÉS BARBITURIQUES

Introduction.

Parmi les toxiques dont la recherche est susceptible d'être demandée à un expert, les poisons organiques sont probablement ceux dont l'isolement et la caractérisation présentent les plus grandes difficultés.

Cela tient à la nécessité d'extraire, à l'état de pureté et sans altération, de faibles doses de ces produits du milieu complexe qui les renferme. Les poisons entraînaient par distillation mis à part, il reste un groupe de corps comprenant les alcaloïdes, les glucosides, les dérivés barbituriques et de nombreux produits médicamenteux, dont l'extraction demande toujours, après un traitement convenable des viscères, la dissolution par un solvant volatil, puis la purification et la caractérisation du toxique dans le résidu de distillation.

Une telle recherche peut être pratiquée, soit sur des viscères, à la suite d'un empoisonnement criminel ou accidentel, soit sur des aliments suspects, soit encore sur le sang d'un malade victime d'une intoxication dont on ignore l'origine. Dans ce dernier cas, qui se rencontre assez fréquemment depuis la vogue des suicides au moyen de dérivés barbituriques, la recherche du toxique présente un intérêt diagnostique et doit pouvoir être effectuée assez rapidement pour fournir des renseignements utiles.

C'est l'étude des méthodes d'extraction de ces toxiques

que M. le professeur Fabre a bien voulu nous confier en insistant particulièrement sur celles ayant pour but la recherche et la localisation dans l'organisme des dérivés barbituriques. Pour ce sujet, qu'il a déjà illustré de nombreuses recherches originales, la direction de M. le professeur Fabre nous a été très précieuse. Nous tenons à lui témoigner ici toute notre reconnaissance et nos sentiments de profonde gratitude pour la bienveillance avec laquelle il nous a accueilli dans son laboratoire et pour la sympathie qu'il nous a toujours témoignée.

M. Paul Chéramy, assistant de la Chaire de Toxicologie à la Faculté de Pharmacie; a bien voulu nous aider de ses conseils au cours de ces recherches, en partie d'ailleurs effectuées sous sa direction dans son laboratoire de l'Hôpital Boucicaut. Qu'il trouve ici l'expression de nos remerciements sincères et l'assurance de nos sentiments dévoués.

A M. Ernest Kahane, chef des Travaux pratiques à l'Institut d'Hygiène Industrielle et de Médecine du Travail, à nos camarades de laboratoire de la Faculté, Mlle M. Th. Régnier, MM. Brard, Couturier et Macario, aux Internes en pharmacie de l'Hôpital Boucicaut : MM. Fauchet et Lavagne, Mlles Boinot et Huteau, qui ont bien voulu s'intéresser à nos recherches et en faciliter souvent la réalisation, nous adressons nos biens vifs remerciements pour leur accueil sympathique et leur cordial dévouement.

* * *

Notre travail comporte les chapitres suivants :

CHAPITRE I. — *Généralités sur les méthodes d'extraction utilisées en toxicologie pour les poisons organiques.*

CHAPITRE II. — *Etude des dérivés barbituriques au point de vue toxicologique, comprenant :*

a) Revue sommaire des propriétés toxiques.

- b) Principales propriétés physiques et chimiques.
- c) Décomposition en milieu alcalin.
- d) Purification des dérivés barbituriques extraits des milieux biologiques.
- e) Réactions d'identification.

CHAPITRE III. — *Méthodes d'extraction des barbituriques des viscères.*

- a) Méthode d'Ogier-Kohn-Abrest.
- b) Méthodes à l'acide trichloracétique.
- c) Méthodes par protéolyse.

CHAPITRE IV. — *Technique proposée, avec emploi d'acétone.*

- a) Considérations générales.
- b) Technique et critique de la technique.

CHAPITRE V. — *Résultats expérimentaux.*

- a) *In vitro* sur des viscères additionnés de toxiques.
- b) *In vivo* : 1° chez le chien ; 2° chez le malade intoxiqué.

CHAPITRE VI. — a) Méthode rapide pour l'extraction des barbiturique du sang.

- b) Recherche des barbituriques dans le lait.

CHAPITRE VII. — *Application de la technique à l'actonée et à la recherche de la strychnine.*

- a) *in vitro*,
- b) *in vivo*.

CONCLUSIONS.

CHAPITRE I

Généralités sur les méthodes d'extraction utilisées en toxicologie pour les poisons organiques.

La première méthode d'extraction des poisons organiques a été imaginée en 1850 par le célèbre chimiste belge Stas [72] à propos d'un empoisonnement par la nicotine (affaire Bocarmé). Stas, qui n'avait en vue que la recherche des alcaloïdes, avait basé sa méthode sur les principes suivants :

- 1^o Les tartrates et les oxalates d'alcaloïdes, sont solubles dans l'eau et dans l'alcool ;
- 2^o Les sels d'alcaloïdes sont décomposés, en milieu aqueux, par les alcalis, avec mise en liberté de l'alcaloïde, soluble dans l'éther.

Le mode opératoire utilisé peut se résumer dans les opérations suivantes : les organes, finement divisés, sont additionnés de 2 fois leur poids d'alcool, le mélange est acidifié par l'acide tartrique (1) et chauffé au bain marie vers 70°; après un certain temps de digestion le liquide est refroidi et filtré. Le résidu et le filtre sont lavés avec de l'alcool concentré et les solutions alcooliques, réunies,

1. L'emploi de l'acide oxalique, un moment envisagé, a été rejeté à cause de l'insolubilité de certains oxalates d'alcaloïdes dans l'alcool et de la nécessité de rechercher parfois l'acide oxalique, à titre de toxique, dans le résidu.

sont distillées à basse température ou évaporées dans le vide, jusqu'à consistance d'extrait. Cet extrait est repris par l'alcool absolu, et la solution filtrée est évaporée à basse température. Son résidu est dissous dans l'eau, la solution acide obtenue est alcalinisée, puis épuisée à plusieurs reprises par l'éther. La solution éthérée laisse à la distillation un résidu constitué par l'alcaloïde impur, qu'il est nécessaire de purifier par les opérations suivantes : reprise par une solution aqueuse d'acide sulfurique dilué, agitation de cette solution avec de l'éther, qui entraîne les impuretés, nouvelle alcalinisation et extraction à l'éther qui fournit l'alcaloïde à peu près pur.

Cette méthode a donné de bons résultats entre les mains de Stas, et son principe est encore à la base des techniques utilisées aujourd'hui ; elle avait toutefois l'inconvénient de fournir un premier résidu alcaloïdique fortement impur. On s'est aperçu qu'on pouvait pallier à cela en pratiquant un premier épuisement de la solution aqueuse par l'éther en milieu acide.

Cette modification, apportée par Otto [52], a conduit à la méthode classique, dite de Stass-Otto, dans laquelle le résidu de distillation des solutions alcooliques est repris par l'eau et la solution acide, ainsi obtenue, est agitée à plusieurs reprises avec de l'éther. L'éther dissout ainsi un grand nombre d'impuretés, qui auraient souillé le résidu alcaloïdique : matières colorantes, acides gras, etc. ; mais il entraîne aussi certains toxiques : glucosides, colchicine, quelques alcaloïdes à tartares dissociables, et enfin, les toxiques de réaction acide, tels que les barbituriques.

Divers perfectionnements ont été successivement apportés à la méthode de Stas-Otto, dans les années qui ont suivi sa découverte. Les modifications ont d'abord porté sur les conditions où se fait l'extraction par macération ou digestion. Divers auteurs, dont Selmi [68], emploient l'alcool et l'acide sulfurique ; d'autres, l'eau acidifiée

par l'acide sulfurique (Dragendorf), par l'acide tartrique (Panzer) [55], par l'acide acétique (Senkowsky) [69], par l'acide chlorhydrique (Erdmann et Uslar [13]). Magnin [46] préconise aussi l'emploi de l'eau acidifiée par l'acide sulfurique, avec précipitation ultérieure au chlorure de plomb, dans le but de purifier le liquide.

L'emploi de solvants divers, à la place de l'éther, a été proposé pour l'extraction des alcaloïdes. Certains d'entre eux, en effet, tels que la morphine, et, dans une certaine mesure, la strychnine, possèdent une solubilité dans l'éther assez faible, pour que leur extraction soit difficile et incomplète. On pouvait d'autre part espérer, par l'emploi de solvants judicieusement choisis, séparer les divers toxiques susceptibles de se rencontrer dans les visères, et par suite dans le résidu d'extraction.

Ces considérations ont conduit Dragendorf [10] à imaginer une méthode qui fait agir successivement plusieurs solvants sur la solution aqueuse de toxiques, d'abord en milieu acide, puis en milieu alcalin. Voici la suite des opérations que l'on doit effectuer dans ce procédé :

a) Extraction par l'eau à 40-50°, avec addition d'acide sulfurique étendu, jusqu'à réaction nettement acide ;

b) Concentration de l'extrait aqueux jusqu'à consistance sirupeuse, macération à 30° pendant 24 heures avec trois ou quatre volumes d'alcool, refroidissement et filtration, lavage avec de l'alcool à 70° ;

c) Distillation de l'alcool, filtration après complet refroidissement du résidu de la distillation, étendu avec un peu d'eau, si c'est nécessaire ;

d) Agitation de la solution aqueuse acide avec de l'éther de pétrole fraîchement rectifié ;

e) Agitation de la solution aqueuse acide avec du benzène ;

f) Agitation de la solution aqueuse acide avec du chloroforme ;

g) Agitation de la solution aqueuse acide avec de l'alcool amylique ;

h) Sursaturation de la solution aqueuse par de l'ammoniaque, agitation à froid du liquide ammoniacal avec de l'éther de pétrole et décantation de ce dernier après un long repos ;

i) Agitation de la solution aqueuse ammoniacale avec du benzène ;

k) Agitation de la solution aqueuse ammoniacale avec du chloroforme ;

l) Agitation de la solution aqueuse ammoniacale avec de l'alcool amylique ;

m) Evaporation à siccité de la liqueur aqueuse ammoniacale avec addition de gypse, extraction du résidu avec du chloroforme.

Cette méthode n'a pas donné les résultats escomptés ; l'action sélective des solvants (aux doses que l'on rencontre dans les expertises toxicologiques) n'étant pas aussi marquée que l'espérait l'auteur. Il en résultait une dispersion des toxiques dans divers extraits, où il était difficile de les identifier. D'autre part, le chauffage, en présence d'acide sulfurique dilué, risquait d'altérer certains poisons tels que les glucosides, l'atropine, la cocaïne. Enfin, des émulsions tenaces se formaient lors de l'épuisement par les divers solvants de la liqueur insuffisamment purifiée. Il faut retenir, néanmoins, de la méthode de Dragendorff l'idée de l'emploi systématique d'autres solvants que l'éther, et en particulier de l'éther de pétrole, dont l'utilisation devait être reprise plus tard.

Revenant à la méthode de Stas-Otto les toxicologues s'attachèrent, sans compliquer les opérations, à perfectionner la technique de manière à obtenir un résidu alcali-

loïdique aussi pur que possible. La plupart des poisons d'origine végétale, aux faibles doses où ils sont retrouvés, sont en effet caractérisés, soit par des réactions chimiques, soit par des réactions physiologiques, qui demandent, pour être pratiquées utilement, des produits d'une grande pureté. Il est nécessaire pour cela, d'éliminer autant que possible toutes les substances étrangères, en limitant leur dissolution au cours de l'extraction par l'alcool tartrique et en les séparant ensuite par l'agitation avec des solvants convenables, n'entraînant pas d'alcaloïdes. Le tout doit comprendre un minimum d'opérations pour éviter des pertes de produits et des altérations, toujours à craindre, pour certaines molécules fragiles.

Ogier, pour l'élimination de la plupart des substances étrangères, indique l'emploi de l'alcool fort, en traitements successifs, et Kohn-Abrest, pour achever la purification ainsi réalisée, épuise la solution aqueuse obtenue par le pétrole léger, qui, dit-il, « n'enlève guère de substances toxiques dans ces conditions, et parfait fort bien la purification ».

Ainsi modifiée par Ogier et Kohn-Abrest, la méthode de Stas-Otto est tout à fait classique et son emploi très répandu.

Certains toxicologues font une reprise par l'eau du résidu de distillation de la première solution alcoolique. Cette opération a pour effet d'éliminer un certain nombre de substances, et en particulier de lipides, qui sont solubles dans l'alcool et insolubles dans l'eau.

En certains cas, Kohn-Abrest [38] a proposé, au lieu de la purification par l'alcool, une sorte de défécation au moyen d'aluminium, activé par contact avec du bichlorure de mercure. Le procédé est intéressant par sa rapidité et sa simplicité ; mais il expose à des pertes, qui peuvent être élevées, pour quelques alcaloïdes.

La purification par précipitation alcoolique reste encore

préférée par la plupart des toxicologues, à cause de ses avantages. Il n'est pas rare toutefois, que la solution aqueuse finale renferme suffisamment d'impuretés pour former des émulsions lors de l'agitation avec les solvants, en milieu acide, et surtout en milieu alcalin. Ces émulsions tenaces sont une cause de perte de temps et rendent difficile l'isolement des produits toxiques à l'état pur. Une technique, indiquée par Cheramy et Lagarce [5], utilisant une précipitation barytique de diverses impuretés, rend de grands services dans la recherche des barbituriques par la méthode d'Ogier. La solution tartrique, additionnée de chlorure de baryum, est filtrée, puis l'excès de baryum est éliminé dans le filtrat au moyen d'acide sulfurique dilué. Ce procédé, exigeant deux filtrations, a donc l'inconvénient de compliquer en apparence les opérations, mais le gain de temps qu'il procure en évitant les émulsions est suffisamment intéressant pour en justifier l'emploi dans nombre de cas.

Cet inconvénient, très sérieux, des émulsions formées lors de l'extraction de la solution aqueuse par les solvants volatils, avait frappé les premiers expérimentateurs et, dès 1889, A. Hilger, P. Küster et K. Jansen [29] avaient donné un procédé qui consistait à pratiquer l'extraction à l'appareil de soxhlet de la solution tartrique, préalablement concentrée, solidifiée par addition de plâtre. La méthode a, paraît-il, donné des résultats très satisfaisants, mais n'a pas été généralisée, par suite des pertes probables par adsorption quand on s'adressait à de faibles doses de toxiques. Cette idée d'épuisement continu, d'un produit amené à l'état sec, se retrouve dans la méthode d'Erdmann et Uslar qui amènent à siccité, en présence de sable, les solutions acides préalablement neutralisées par l'ammoniaque; la matière pulvérulente est, dans ce cas, extraite à chaud par l'alcool amylique. Ce dernier procédé a le gros inconvénient de perdre les alcaloïdes volatils, sans

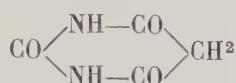
compter les altérations possibles des autres produits au cours de la dessiccation.

Dans ces dernières années on a préconisé deux types de méthodes qui s'éloignent des procédés classiques. Les unes, comme celle de Fabre, utilisent la digestion fermentaire des viscères, les autres, telles que celle de G. Florence emploient la défécation trichloracétique des produits biologiques. Nous reviendrons sur ces deux méthodes et ferons leur étude critique à l'occasion de la recherche des barbituriques dans les viscères.

CHAPITRE II

Etude des dérivés barbituriques au point de vue toxicologique.

Nous croyons utile de rappeler ici les principales propriétés des barbituriques intéressant leur recherche toxicologique. Ces composés constituent des dérivés de la malonylurée ou acide barbiturique dont la formule est :



Les atomes d'hydrogène, du groupe méthylénique, peuvent être substitués par des radicaux alkylés ou arylés, les deux radicaux pouvant être semblables ou différents, ce qui donne des dérivés symétriques ou dissymétriques de formules générales :



Le nombre de ces dérivés, d'usage thérapeutique, augmente chaque jour. Citons les principaux :

Diéthylmalonylurée (Véronal, Barbital) P. F. 191°

Phényléthylmalonylurée (Gardénal, Luminal) P. F. 170°-172°.

Di-allylmalonylurée (Dial) P. F. 170°-171°.

- Butyléthylmalonylurée (Sonéryl) P. F. 123°.
Phénylméthylmalonylurée (Rutonal) P. F. 220°.
Di-propylmalonylurée (Proponal) P. F. 145°.
Ethylisoamylmalonylurée (Amytal) P. F. 155°.
Altylisopropylmalonylurée (Numal) P. F. 137°.
Isobutylallylmalonylurée (Sandoptal) P. F. 137°-138°.
Bromopropényl-isopropylmalonylurée (Noctal) P. F. 178°.
Bromopropénylbutylmalonylurée (Pernoctone) P. F. 130-132°.
N-Dibromo propényl diéthylmalonylurée (Diogénal) P. F. 126°.
N-Méthyl-phényléthylmalonylurée (Prominal ou Isonal) P. F. 176-177°.
Cylohexényléthylmalonylurée (Phanodorme) P. F. 173°.

a) Revue sommaire des propriétés toxiques.

L'étude de la recherche toxicologique des barbituriques est actuellement très importante, par suite de la grande fréquence des suicides au moyen de ces médicaments. Nous avons nous-même été frappé du grand nombre d'intoxiqués de ce genre qui sont traités dans les hôpitaux parisiens. C'est ainsi que, pour le petit secteur de l'agglomération parisienne desservi par l'Hôpital Necker, il dépasse 40 pour l'année 1933 et qu'à l'Hôpital Boucicaut, il nous a été donné d'en observer une dizaine de cas pendant notre séjour au laboratoire.

Cette fréquence doit s'expliquer par la facilité avec laquelle les désespérés peuvent se procurer ces toxiques et l'espoir qu'ils ont d'obtenir, par ce moyen, une mort rapide et sans souffrances. Beaucoup d'intoxiqués sont des malades nerveux, familiarisés déjà avec ces dérivés

hypnotiques, qui leur ont été prescrits dans un but médicamenteux. Ils en connaissent l'efficacité et le danger, mais se laissent tenter, au cours d'une crise morbide, par cette « euthanasie » dont ils ont les moyens à leur disposition. La publicité faite par la Presse, au sujet de ces suicides, engage ensuite d'autres désespérés à utiliser ces toxiques.

D'assez nombreuses intoxications accidentelles sont connues, elles proviennent généralement de l'administration d'une dose trop élevée ou d'une sensibilité particulière du sujet à ce genre de médicaments.

A cause de la forte dose nécessaire pour causer la mort, l'emploi criminel des barbituriques ne s'est heureusement pas répandu. Il semble toutefois que, dans une affaire judiciaire actuellement en cours, il ait été fait usage d'un dérivé barbiturique pour occasionner la mort ; ce serait, à notre connaissance, le premier cas signalé, en France, d'un tel emploi de ces hypnotiques.

Le pourcentage des intoxications par les barbituriques atteint en moyenne 15 %, il augmente de jour en jour. Selon une statistique récente, un hôpital de Budapest qui avait, en 1923, reçu 24 de ces intoxiqués, en a reçu 122 en 1924 et 167 en 1932.

Il semble, dans ces conditions, utile de suivre les vœux émis par la Société de Pharmacie de Paris, la Société de Thérapeutique, la Société de Médecine Légale, l'Académie de Médecine, proposant une réglementation de la vente de ces produits.

Dans certains pays (Angleterre, Allemagne), où des mesures ont été prises dans ce sens, les statistiques montrent que le nombre d'accidents dus aux dérivés barbituriques a diminué (Le Guillant [45]).

Les doses toxiques des dérivés barbituriques sont variables avec le produit considéré et, pour un même produit, avec l'état du sujet ; en particulier le fonction-

nement de ses reins et de son foie (Tardieu [77]). Le véronal à la dose de 3 à 5 gr. provoque déjà une intoxication grave, la dose sûrement mortelle étant voisine de 10 gr. On cite toutefois des cas de doses supérieures ingérées sans provoquer la mort, en particulier Tardieu et Camps [76] relatent l'observation d'un malade guéri après ingestion de 24 gr. de véronal. Pour les autres dérivés barbituriques, qui sont actifs à dose plus faible, des quantités de quelques grammes suffisent pour amener la mort.

Les symptômes de l'intoxication barbiturique ont été bien décrits par Ramond [60] et par divers autres auteurs ; ils comportent une phase ébrieuse, assez courte, puis survient la phase comateuse, qui débute par un sommeil profond, et se poursuit par un état grave, avec disparition totale de la sensibilité tactile et sensorielle ; le réflexe cornéen est aboli. La respiration est lente, le pouls régulier, il existe un état congestif marqué, avec cyanose. Dans les cas sérieux il se produit une évolution fébrile avec température s'élevant progressivement. Chez la malade de l'Hôpital Boucicaut, que nous désignons sous le nom de cas n° 3, la température, normale le premier jour, s'est élevée peu à peu, pour dépasser 42° peu avant la mort. Les suites de ces intoxications sont variées, il faut citer des éruptions ou érythèmes, « toxicodermies barbituriques » de formes diverses, qui apparaissent quelques jours après l'ingestion du toxique.

Le traitement de ces intoxications comprend d'abord, comme pour tous les empoisonnements par ingestion, l'évacuation de l'estomac par vomissements provoqués, ou mieux par lavage. Il est de règle de pratiquer ensuite des saignées abondantes, préconisées par Tardieu [75], et qui contribuent à éliminer le toxique ; elles seront suivies d'injections de sérum glucosé. On a proposé également les transfusions sanguines. A cela on ajoutera une

thérapeutique symptomatique par injections stimulantes de caféine, huile camphrée, spartéine.

Depuis quelques années on a proposé le traitement des intoxiqués par les barbituriques au moyen de hautes doses de strychnine. Cette thérapeutique a été préconisée, dans sa forme actuelle, par Ide, de Louvain, et citée dans une communication de Mme Bertrand Fontaine à la Société Médicale des Hôpitaux de Paris (novembre 1933). Les malades ayant absorbé de très hautes doses de barbituriques sont traités par des injections de strychnine, souvent par voie intraveineuse, répétées toutes les heures. Une thérapeutique analogue a été appliquée par M. Marcel Brulé [3] qui, chez un malade ayant absorbé 5 gr. de gardénal, intervient 17 heures après l'empoisonnement en injectant 1 cgr. de strychnine toutes les 2 heures, et parvient à sauver le malade après 4 jours de traitement et l'administration de la dose énorme de 46 cgr. de sulfate de strychnine en 4 jours. C'est d'ailleurs à des doses de cet ordre : 38, 39, 44 et 48 cgr. qu'ont eu recours d'autres expérimentateurs. Il ne semble pas possible de fixer la quantité de strychnine à injecter d'après la dose de barbiturique absorbée, on est d'ailleurs souvent dans l'ignorance de celle-ci ; il faut suivre les réactions du sujet et poursuivre le traitement à la strychnine jusqu'à réapparition des réflexes. La dose de 1 gr. 60 a même été utilisée par MM. Ch. Flandin et J. Bernard [19] dans un cas très grave d'intoxication par 15 gr. de gardénal, sans d'ailleurs amener la guérison. Ces mêmes auteurs, à la suite de cet insuccès et des résultats plus favorables obtenus par inhalation de « carbogène », préconisent l'emploi de cet agent thérapeutique.

Si nous avons insisté sur ce nouveau mode de traitement, c'est d'une part à cause de son efficacité, là où d'autres méthodes échouent, d'autre part à cause des doses surprenantes de strychnine qu'il amène à utiliser,

et qui s'expliquent sans doute par un antagonisme frappant entre les deux médicaments. C'est en raison enfin de l'intérêt qu'il présente pour le toxicologue qui peut être amené à extraire des viscères les barbituriques et la strychnine.

Nous avons tenu, au cours de notre travail, à réaliser une expérience toxicologique de ce genre sur l'animal, nous donnant l'occasion de la recherche de ces toxiques dans des conditions voisines de celles rencontrées dans la pratique.

b) Principales propriétés physiques et chimiques.

Les dérivés barbituriques présentent l'aspect de petits cristaux incolores ou de poudres microcristallines. Leurs points de fusion s'échelonnent entre 123° et 220° . A une température inférieure à leur point de fusion, ils se subliment, généralement avec facilité et sans décomposition.

Leur solubilité dans l'eau est faible ; de 1 pour 145 parties pour le véronal, 1 pour 1040 pour le gardénal, elle diminue encore au fur et à mesure que l'on s'élève dans la série ; elle est toutefois beaucoup plus marquée dans l'eau chaude. Certains solvants organiques : éther sulfurique, éther acétique, acétone, dissolvent abondamment les dérivés barbituriques. Par contre, l'alcool froid, le chloroforme, la benzine, sont pour eux des solvants médiocres. Enfin, dans l'éther de pétrole, leur solubilité est très faible, de l'ordre de 1 mgr. pour 100 cmc. d'après les expériences que nous avons réalisées.

Les atomes d'hydrogène, fixés à l'azote, dans le noyau malonylurée sont situés entre deux carbonyles, et possèdent de ce fait des propriétés acides. Il en résulte pour les dérivés barbituriques une solubilité marquée dans les

liqueurs alcalines : soude diluée, ammoniacque, carbonate de soude ; certaines bases organiques, comme la diéthylamine les dissolvent également.

On leur connaît des dérivés métalliques définis, tels que les sels alcalins, qui sont utilisés en thérapeutique (véronal sodé, gardénal sodé).

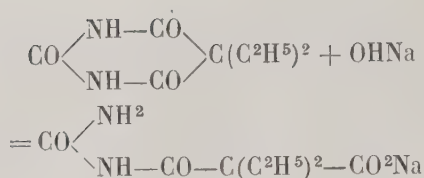
Sous l'action des alcalis à chaud, ils fournissent un dégagement d'ammoniaque, provenant de la décomposition du reste uréique.

Ils donnent avec certains réactifs : réactif de Millon, sulfate mercurique (formule Denigès), nitrate d'argent ammoniacal, des précipités abondants, l'action du chlorure mercurique, ajouté en solution saturée à leur solution aqueuse, provoque, dans des conditions déterminées (Fleury [23]), des précipités qui permettent de les différencier.

La possibilité d'obtenir des produits de condensation des barbituriques avec le xanthidrol, a permis à M. Fabre de préparer des dérivés utilisés pour leur caractérisation.

c) Altération des dérivés barbituriques en milieu alcalin.

Les dérivés barbituriques donnent, avec les alcalis, des sels solubles, mais ces produits sont très instables en solution aqueuse, surtout en présence d'un excès d'alcali. Ce fait, bien connu des pharmacologues, présente également un intérêt en toxicologie. La nature des produits formés, lors de la décomposition des barbituriques en milieu alcalin, est très variable suivant les conditions où l'on se trouve. Lebeau et Courtois [44], dans leur *Traité de Pharmacie Chimique*, indiquent l'altération rapide du véronal sodique en solution aqueuse et la formation, par hydrolyse, d'un acide uréino-carbonique, dépourvu de propriétés hypnotiques, suivant la réaction :



Une réaction analogue se passe dans le cas du gardénal sodique et semble être générale.

Nous avons pu, par nous-même, constater le peu de stabilité du véronal en solution alcaline par la soude. Une dissolution de 1 gr. de véronal dans 100 cmc. d'eau, additionnée de 4 cmc. de soude, préparée pour diverses expériences, n'a pu être utilisée immédiatement. Lors de son emploi ultérieur des résultats aberrants ont été obtenus, particulièrement dans les épreuves de micro-sublimation. Le produit sublimé, au lieu d'être nettement cristallisé, présentait un aspect huileux en certains points. A titre de confirmation la solution suspecte a été acidifiée par l'acide chlorhydrique et épuisée à l'éther. L'éther a laissé à la distillation un résidu légèrement huileux mais qui a cristallisé rapidement dans des formes analogues à celles qu'on observe fréquemment pour ce dérivé barbiturique. Mais le produit ainsi isolé, purifié par recristallisation, présentait un point de fusion de 125°, différant par suite de celui du véronal (1910). Cette expérience nous ayant montré, de façon frappante, l'altération rapide des barbituriques en milieu alcalin, nous avons entrepris des essais systématiques pour étudier l'influence sur ces produits des divers traitements qui leur sont appliqués dans la recherche toxicologique.

Nous avons préparé trois solutions contenant chacune 2 mgr. de véronal dans 100 cmc. d'eau distillée. La première a été additionnée de 10 cmc. de solution 0,1 N d'ammoniaque, la deuxième de 10 cmc. de solution 0,1 N de soude, la troisième, à titre de témoin, de 10 cmc. d'eau distillée. Les deux premières solutions, après un

séjour de 6 heures à la température du laboratoire, ont été agitées avec 100 cmc, puis 55 cmc. d'éther, pour pratiquer un épuisement en milieu alcalin, comme il est indiqué dans certaines techniques toxicologiques. Les trois solutions ont été ensuite acidifiées par l'acide chlorhydrique et épuisées par l'éther ; les solutions éthérées distillées et les résidus soumis à la microsublimation suivant la technique habituelle. Les produits sublimés correspondant aux deux premières solutions, où le véronal s'est trouvé pendant plus de 6 heures en milieu alcalin, sont constitués, pour la plus grande part, de cristaux bien formés, mais, à la partie supérieure du tube, on observe des gouttelettes qui renferment probablement des produits de décomposition mêlés à du véronal. Ces gouttelettes ont d'ailleurs cristallisé partiellement au bout d'un certain temps. La quantité de produit sublimé à l'état liquide a été notablement supérieure dans le tube correspondant à l'alcalinisation par la soude que dans celui provenant de l'action de l'ammoniaque. Enfin, le tube correspondant au témoin renferme uniquement un produit bien cristallisé, donnant au bloc de Maquenne le point de fusion du véronal (191°).

Bien que les conditions où nous avons opéré ne soient pas exactement celles dans lesquelles on pratique habituellement l'extraction toxicologique, nous pensons que leur résultat présente un intérêt et engage à éviter, autant que possible, un contact prolongé des barbituriques avec les solutions alcalines. Dans le cas où il serait indispensable d'opérer dans un tel milieu, nous pensons qu'il faut s'adresser à une solution alcalinisée par l'ammoniaque, l'expérience ci dessus, et d'autres essais, nous ont en effet montré, qu'à alcalinité égale, l'altération était moindre dans ces conditions.

Cette action des alcalis sur les barbituriques nous a fait également restreindre l'usage d'une méthode de puri-

fication des extraits toxicologiques, utilisant l'eau de baryte. Nous avons constaté qu'une solution de baryte à 1 % provoquait déjà, au cours des opérations, une transformation notable du barbiturique à purifier. L'emploi d'un mélange ammoniacal-chlorure de baryum atténue fortement cet inconvénient. C'est pourquoi nous le conseillons quand une telle purification doit être pratiquée.

L'action des alcalis sur les barbituriques peut conduire à toute une série de corps suivant l'intensité de l'attaque. Celle-ci porte toujours sur le noyau de la malonylurée qui peut donner différents corps : acides uréine-carboniques, amide-maloniques, acides acétiques substitués. Un certain nombre de produits de ce type auraient, d'après les recherches de divers auteurs (H. H. Shoule, A. K. Keltsch, G. F. Kempf et E. E. Swanson [71], W. Koenig et H. Kluge [37]), été retrouvés dans les urines de malades ayant absorbé des barbituriques tels que le gardénal, l'amytal, etc. Il semble donc que les barbituriques donnent, sous l'action des alcalis, à peu près les mêmes produits de décomposition que par métabolisme dans l'organisme.

Nous rappellerons également à ce sujet que M. Kohn-Abrest [39] a indiqué la présence d'acide sulfo-cyanique dans les viscères de sujets intoxiqués par les barbituriques.

Un fait nous paraît intéressant au point de vue toxicologique : les solutions de barbituriques, traitées par les alcalis, fournissent ensuite un abondant précipité par le sous-acétate de plomb. Nous l'avons vérifié dans plusieurs cas et par comparaison avec du véronal pur. Nous avons même obtenu la précipitation plombique des solutions aqueuses obtenue à partir de véronal altéré par les alcalis et extrait ensuite par l'éther. Nous pensons que la précipitation plombique des produits, dérivés du véronal et

d'autres barbituriques, explique les pertes observées lors de la défécation de certaines urines d'intoxiqués. Elle explique également la « disparition » du véronal dans les urines abandonnées à la fermentation. Il est probable qu'en effet, dans ce dernier cas, les produits d'altération du véronal ont été entraînés dans le précipité plombique, surtout si la réaction du liquide, en fin de précipitation, était alcaline. Dans d'autres cas, au contraire, ces produits ont pu souiller le véronal extrait, sans que leur présence soit supposée, car ils donnent, la plupart du temps, un aspect cristallin normal au résidu et ne sont décelés que par la détermination du point de fusion et la microsublimation.

d) Procédés de purification des barbituriques.

Quel que soit le procédé d'extraction utilisé, on n'obtient jamais d'emblée les dérivés barbituriques à l'état de pureté parfaite. Il est bon de savoir que des résidus, nettement cristallisés, incolores ou peu colorés, renferment souvent une quantité notable d'impuretés, qui se manifeste d'ailleurs par une modification considérable du point de fusion ; celui-ci ne pouvant le plus souvent être déterminé avec netteté sur de tels produits. L'obtention de résidus cristallisés impurs explique sans doute les rendements variables, et souvent très élevés, signalés par divers auteurs. Nous avons extrait de viscères, des dérivés barbituriques de très bel aspect, qui contenaient 35 % d'impuretés.

Il est donc indispensable de soumettre les produits isolés à une purification suffisante pour obtenir un produit de point de fusion fixe et voisin de celui du corps recherché. Les barbituriques extraits des urines, surtout après défécation, sont relativement purs et ne contiennent pas

d'impuretés difficiles à éliminer. Il n'en est pas de même des barbituriques extraits des viscères, surtout de ceux ayant subi un commencement de putréfaction. On obtient alors des résidus souillés de lipides et de diverses substances, improprement appelées résines, qui semblent être des pigments et des cholestérols. La solubilité de ces substances est, la plupart du temps, analogue à celle des barbituriques, ce qui fait qu'elles les accompagnent pendant toutes les phases des procédés d'extraction et qu'elles se retrouvent dans la solution aqueuse destinée à être épuisée par l'éther. De nombreuses techniques ont été proposées pour tenter la séparation des barbituriques d'avec des substances.

1^o *Purification par le charbon animal.* — Le charbon animal a été préconisé par divers auteurs. M. Fabre indique de reprendre le résidu par de l'eau, d'ajouter du charbon animal et de porter le mélange au bain-marie bouillant pendant 30 minutes; filtrer, laver le filtre, puis évaporer la solution aqueuse au bain-marie.

Des techniques analogues ont été suivies par Nolte [50], Frerichs [27], Venturoli [83], Lagarce [43], Koenig et Kluge [37].

Il est important de vérifier au préalable que le charbon utilisé ne possède pas de pouvoir adsorbant sensible vis-à-vis des dérivés barbituriques, tout en ayant une efficacité élevée comme décolorant. Sur les conseils de M. Fabre nous avons utilisé le charbon « Norit », de Poulenc, qui nous a donné satisfaction à ce double point de vue.

Les purifications au moyen du noir peuvent être répétées au besoin sans grand inconvénient; Lagarce a montré que trois reprises successives par l'eau, avec décoloration au noir, n'occasionnaient pas une perte de dérivé barbiturique supérieure à 10 %.

Vitte [84] préfère employer le charbon en milieu alcal-

linisé par l'ammoniaque, il acidifie ensuite la solution filtrée et l'extrait à l'éther.

Strzyzowsky [73] opère également en milieu alcalin, en dissolvant le résidu par l'eau chaude, puis alcalinisant par la soude et laissant en contact, pendant 12 heures à froid, cette solution alcaline avec le noir animal. Ces procédés ne paraissent pas avantageux ; d'une part, nous avons observé que les solutions alcalines se décoloraient mal par le noir, et, d'autre part, les dérivés barbituriques subissent en milieu alcalin des altérations non négligeables.

Molle et Kleist [49] ont utilisé le charbon pour la purification des barbituriques extraits des urines. Pour cela, après défécation au plomb, l'excès de ce métal est éliminé par l'hydrogène sulfuré ; le liquide filtré est traité par le noir animal avant l'extraction à l'éther.

Desodt [9] dissout dans l'alcool le résidu de barbituriques, filtre et évapore au bain-marie. Le nouveau résidu est repris par l'eau en présence de noir animal.

Kuhn [41] complète la purification par le charbon par une sublimation.

Dans bien des cas la purification au charbon ne suffit pas à éliminer toutes les substances étrangères, tout au plus amène-t-elle à une bonne décoloration, il reste souvent des impuretés, non absorbables par le charbon. C'est pourquoi, dans quelques cas, M. Fabre a proposé, après l'action du charbon, de soumettre la solution aqueuse à la dialyse en sac de collodion.

2° Purification par le permanganate. — La purification par le permanganate de potassium a été proposée par van Itallie et Steenhauer [79]. Le résidu d'évaporation de l'éther acétique, employé pour l'extraction par ces auteurs, est dissous dans 10 cmc. d'eau bouillante, additionnée de 5 cmc. d'acide sulfurique dilué, et de solu-

tion N/10 de permanganate de potassium jusqu'à décoloration du liquide. L'excès de permanganate est décomposé par l'eau oxygénée et le liquide est épuisé par deux volumes d'éther acétique.

Van Rijn [81] et Coronedi [7] ont également employé la purification par le permanganate de potassium.

Nous ne pensons pas que cette méthode possède de grands avantages sur la décoloration au charbon, elle risque de provoquer des altérations dans les dérivés barbituriques, à chaînes latérales particulièrement sensibles, tels que les dérivés allylés, et, par contre, elle ne peut avoir aucune action sur les corps lipidiques et les cholestérols qui peuvent les accompagner.

3° *Purification par l'aluminium activé.* — La méthode à l'aluminium activé, proposée par Kohn-Abrest [28] pour les alcaloïdes, a été appliquée par Sensi [70] à la purification des résidus contenant des barbituriques. Il a employé la technique suivante : « Dissoudre le résidu « dans l'alcool bouillant, filtrer, et dans le liquide filtré. « introduire 7 % d'aluminium activé. Laisser 24 heures « en contact, filtrer, évaporer et peser ». L'auteur dit avoir obtenu des produits très purs avec de très bons rendements.

Nous avons essayé cette technique en prenant 0 gr. 10 de véronal dissous dans de l'éther contenant des lipoides du foie et du cholestérol. Le résidu d'évaporation de la solution étherée a été repris par l'alcool bouillant. La solution alcoolique, filtrée, acidifiée par 3 gouttes d'acide acétique est mise en contact, pendant 24 heures, avec 5 gr. d'aluminium activé selon la technique de Kohn-Abrest. Après nouvelle filtration (il est à noter que la filtration est lente et difficile) la solution est évaporée dans un cristalliseur taré ; le résidu pèse 0 gr. 131 et est d'un aspect jaunâtre et mal cristallisé. Cette méthode de purification

s'est donc montrée incapable d'éliminer les impuretés lipidiques qui souillent si souvent les barbituriques extraits des viscères. Elle peut être efficace comme méthode de décoloration et d'élimination des résidus protéiques, mais ces produits étant facilement enlevés par le charbon, nous croyons préférable de nous en tenir à cet agent de purification.

4° *Purification par hydrolyse des dérivés xanthylés.* —

Il est possible, lorsque l'on possède quelques cgr. de produit, d'utiliser comme moyen de purification des extraits viscéraux, contenant des barbituriques, la formation des dérivés xanthylés, étudiés par M. Fabre [16 et 17], et qui constituent un des procédés spécifiques d'identification de ces corps. Les dérivés xanthylés sont en effet susceptibles, par hydrolyse au moyen d'alcool chlorhydrique au 1/5, à chaud, de régénérer, sans altération, les barbituriques qu'ils contiennent et que l'on peut facilement séparer des produits d'oxydation du xanthidrol qui les accompagnent alors. Il suffira donc, en présence d'un extrait viscéral, contenant une dose suffisante de barbiturique, de former le dérivé xanthylé, que l'on essaiera de caractériser par son point de fusion et dont l'hydrolyse fournira, à l'état de pureté, l'hypnotique contenu dans les viscères.

5° *Purification par précipitation à l'état de complexe mercuriel.* — La précipitation des dérivés barbituriques par le sulfate mercurique a été utilisée par MM. Fleury et Guinebault [24] pour la séparation de ces corps des impuretés enlevées par l'éther aux urines déféquées à l'acétate neutre de plomb. Pour cela le résidu d'évaporation de l'éther est repris par l'eau chaude et filtré ; dans la solution obtenue on verse goutte à goutte une solution contenant, pour 100 cmc., 7 gr. de sulfate mercurique, et 4,5 cmc. d'acide sulfurique. Le précipité volumineux est

centrifugé, lavé à l'eau, puis dissous dans de l'eau acidifiée par l'acide chlorhydrique. Dans cette solution on élimine le mercure par l'hydrogène sulfuré et, après filtration, on extrait le barbiturique par l'éther. Cette méthode a l'inconvénient, que l'on rencontre dans d'autres méthodes de précipitation des barbituriques, d'entraîner quelquefois des impuretés précipitables également par le sulfate mercurique et qui se retrouvent dans le dernier extrait éthéré, si bien qu'il est parfois nécessaire de décolorer au noir comme ultime purification. Le procédé reste précieux pour l'extraction des barbituriques des urines, car les inconvénients que nous signalons se produisent surtout avec les extraits viscéraux, plus complexes.

6° Purification par précipitation à l'état de complexe de cuivre et de pyridine. — Les dérivés barbituriques, dissous dans l'eau alcalinisée par la pyridine, fournissent par addition de sulfate de cuivre des précipités cristallins, de couleur rose violacée, de formule :



Sous l'action des acides dilués, ces complexes sont dissociés en libérant les barbituriques inaltérés.

Zwikker [87] a proposé cette réaction pour l'identification des barbituriques, et l'a appliquée ensuite à la purification des résidus d'extraction de ces produits dans les urines, en mettant à profit la solubilité restreinte du complexe et sa décomposition par les acides. Pour cela le résidu est dissous dans quelques cmc. d'eau additionnée d'un peu de pyridine. La solution, diluée légèrement pour amener la précipitation de produits insolubles, est filtrée. On l'additionne alors goutte à goutte, jusqu'à coloration bleue persistante, du réactif précipitant, qui possède la composition suivante :

Solution de sulfate de cuivre à 10 %.....	4 cmc.
Pyridine.....	1 cmc.
Eau distillée.....	5 cmc.

Il se produit un précipité cristallin, rose violacé, qu'on laisse déposer pendant 1/4 d'heure, sépare sur un filtre et lave à l'eau contenant de la pyridine. Le précipité est dissous sur le filtre par l'acide sulfurique dilué et la solution est extraite par l'éther, qui enlève le barbiturique.

Les essais que nous avons pratiqués de cette méthode nous permettent de penser qu'elle ne convient pas à la purification des résidus toxicologiques, riches en impuretés, et ne contenant que de faibles quantités de barbituriques. Lors de la reprise du résidu par la solution de pyridine, et surtout après dilution, il se forme une liqueur trouble, colloïdale, filtrant lentement, sans se clarifier complètement. La formation du précipité est lente et il faut plus d'un quart d'heure pour qu'il se dépose à l'état cristallisé.

Voici les résultats d'un de nos essais :

Cinquante mgr. de véronal sont dissous dans quelques cmc. d'éther avec 2 cgr. de lipoides de foie. Le résidu d'évaporation de l'éther est traité suivant la technique décrite et, après purification, on trouve 40 mgr. 5 de produit dont le point de fusion est nettement plus bas que celui du véronal (155° au lieu de 191°). Le rendement a donc été de 81 % environ et la purification imparfaite.

F. Weiss [85], dans le but de séparer les dérivés barbituriques de l'acide succinique, qui selon van Itallie et Steenhaur [80] se rencontre parfois dans les extraits de viscères, utilise un procédé original. L'extrait est repris par une solution aqueuse de carbonate de soude à 2 % qui doit rester alcaline au rouge de méthyle. La solution alcaline est épuisée par l'éther, qui, dans ces conditions, enlève le barbiturique seul. Un procédé analogue est indiqué par

Kœning et Kluge [37] pour la séparation de l'acide hippurique du gardénal dans les urines des malades ayant absorbé ce médicament. Le résidu éthéré est repris par l'eau chaude et un peu de charbon animal. La solution aqueuse est filtrée, refroidie, alcalinisée avec de la lessive de soude diluée et extraite ensuite par agitation avec l'éther jusqu'à épuisement. Ceci donne la solution éthérée *A* dont la distillation laisse un résidu huileux difficile à identifier. La solution aqueuse est alors acidifiée par l'acide sulfurique dilué, puis neutralisée par le bicarbonate de soude en poudre, jusqu'à réaction alcaline au tournesol (pH : 7,5 environ). Elle est ensuite extraite de nouveau par l'éther, ce qui donne la solution éthérée *B* qui contient le gardénal. Si l'on acidifie franchement par l'acide sulfurique la solution aqueuse, on peut extraire par l'éther (solution *C*) l'acide hippurique.

Ces deux procédés sont intéressants quand on craint que le résidu d'extraction soit souillé par l'acide succinique ou l'acide hippurique. Nous avons constaté qu'effectivement les dérivés barbituriques, en solution dans le carbonate ou le bicarbonate de soude, et par suite en absence d'alcali libre, se laissent enlever par agitation de l'éther. C'est une propriété curieuse qui s'explique par la faible acidité de ces dérivés. (Le véronal, en solution $\frac{M}{100}$ a un pH de 5,6.)

Malheureusement, dans les essais que nous avons pratiqués, il ne nous a pas paru que la séparation soit totale, une partie du barbiturique est retenue par la solution alcaline et le rendement est défectueux, ne dépassant pas 60 %. Toutefois cette méthode est intéressante pour les cas où l'on doit séparer les dérivés barbituriques de produits acides de propriétés voisines. Nous l'avons en particulier mise à contribution pour la séparation du véronal de l'acide trichloracétique dans les extraits obtenus par les méthodes de Florence et de Vitte [84].

7° *Purification au moyen de la baryte.* — La plupart des impuretés qui accompagnent les barbituriques sont de nature acide et lipoïdique. Nous basant sur les bons résultats fournis par la méthode de Cheramy et Lagarce, au chlorure de baryum, pour la défécation des extraits obtenus par la méthode de Stas-Otto, nous avons essayé d'appliquer une purification à la baryte aux résidus de l'éther acide. Dans nos premiers essais le résidu impur était repris à chaud par l'eau de baryte à 5 %, la solution était refroidie et filtrée, acidifiée par l'acide chlorhydrique et épuisée à l'éther. L'évaporation de l'éther laissait un résidu parfaitement incolore et bien cristallisé et on remarquait qu'il était resté sur le filtre un abondant résidu, constitué vraisemblablement par les combinaisons barytiques des lipoïdes.

Malheureusement l'alcalinité de l'eau de baryte est suffisamment élevée pour provoquer une altération des dérivés barbituriques, comme on peut le constater en déterminant le point de fusion du produit extrait ou en procédant à sa microsublimation. L'altération par les alcalis étant moins intense en milieu ammoniacal, comme le prouvent des essais que nous avons pratiqués, nous avons modifié la technique de la façon suivante :

Le résidu est repris à chaud (au bain-marie vers 60°) par l'ammoniaque à 2 % ; à la solution on ajoute quelques gouttes de chlorure de baryum à 10 %. Il se forme un abondant précipité, on refroidit et on filtre. Le liquide acidifié par l'acide chlorhydrique est épuisée à l'éther. Par évaporation de l'éther il reste un résidu bien cristallisé. Nous avons constaté que, dans ces conditions, l'altération produite par le milieu alcalin est minime. Ce procédé de purification nous paraît devoir être appliqué toutes les fois qu'un résidu abondant est fortement souillé de produits lipoïdiques acides. Si le résidu est fortement coloré, on pourra faire précéder l'action de la baryte

d'une décoloration au noir. Le barbiturique isolé est suffisamment pur pour être caractérisé par ses réactions. L'altération subie au cours de la purification est si minime que le poids de produit obtenu correspond sensiblement à celui du corps pur. Le rendement est toujours excellent, de 85 à 90 %. Un tel procédé nous paraît susceptible de rendre des services pour la purification des extraits (extraits d'urines par exemple) où l'on cherche simplement à caractériser un dérivé barbiturique.

8° *Purification par microsublimation.* — C'est une propriété connue depuis longtemps que les dérivés barbituriques sont sublimables sans décomposition et l'utilisation de cette propriété pour leur identification et purification a été recommandée par Ogier et Kohn-Abrest [51] et par Gadamer [28] dans leurs traités classiques de toxicologie.

De nombreux auteurs ont employé la microsublimation dans leurs recherches sur les barbituriques, citons, à peu près dans l'ordre chronologique : Tunmann [78], Keeser [34], Fischer [24], Ehrishmann et Joachimoglu [12], Lagarce [43], Kaiser [32], Fabre [17 bis] et Shoule, Keltch, Kempf et Swanson [71].

La façon de réaliser la microsublimation varie très notablement suivant les auteurs. Les uns opèrent à la pression normale, d'autres sous pression réduite et même dans un vide profond. Dans certains cas le produit sublimé est recueilli sur une surface refroidie. Les dimensions des appareils, la durée de la chauffe et la température atteinte, sont très diverses. Celle-ci en particulier varie, suivant les auteurs, de 80 à 200°. De nombreux appareils ont été décrits pour la sublimation. Citons ceux de Eder et Haas [11] à pression réduite, de Klein et Werner [36] qui utilisent en même temps le refroidissement, de Mayrhofer [48], de Fischer [20], de Ehrishmann et Joachi-

moglu qui opèrent à la pression atmosphérique. La plupart de ces appareils sont d'usage très général, et peuvent être utilisés à la purification de nombreux produits sublimables que l'on peut avoir à identifier en chimie analytique et en toxicologie. L'emploi de ces appareils semble avantageux, mais il n'est pas possible dans tous les laboratoires. Sur les conseils de M. Fabre, nous avons effectué les microsublimations par un procédé très simple, que nous décrivons ci-après, et qu'il est facile de réaliser dans tout laboratoire. Il faut bien noter que la sublimation ne peut, de toutes façons, être appliquée avec avantage qu'à un produit suffisamment purifié.

L'étude critique des méthodes de purification nous montre donc que la plupart des procédés proposés présentent des inconvénients ou des imperfections. Nous avons jugé que les résultats les meilleurs devaient être fournis par l'emploi combiné de la décoloration au noir, en milieu aqueux neutre, et de la microsublimation. C'est pourquoi nous nous sommes arrêté à la technique suivante :

TECHNIQUE DE PURIFICATION.

Le résidu d'évaporation de l'éther acide est repris par l'eau, en présence d'une pincée de noir décolorant « norit » de Poulenc. On chauffe au bain-marie, pendant 15 à 30 minutes, on filtre, et on lave le filtre avec un peu d'eau chaude. La solution aqueuse est acidifiée par l'acide chlorhydrique et agitée avec de l'éther. On renouvelle l'épuisement à l'éther et les liqueurs éthérées réunies sont distillées. Si le résidu obtenu n'est pas suffisamment décoloré, on répète l'opération, à moins qu'il ne s'agisse de très petites quantités. Dans ce cas pour éviter des pertes on pratique directement la microsublimation.

La microsublimation peut d'ailleurs être effectuée sans décoloration au noir sur les résidus ne contenant que de petites quantités d'impuretés ou sur ceux provenant de petits organes.

Le résidu de distillation contenant le barbiturique décoloré, est repris par 5 à 10 cmc. d'éther. Cette solution est introduite par petites portions dans un tube à essais de 8 mm. de diamètre. Le tube est chauffé sur un bain-marie pour provoquer au fur et à mesure l'évaporation de l'éther. Cette opération est difficile à réaliser sans projections qui risquent d'occasionner des pertes et de toutes façons dispersent le produit sur les parois du tube. Pour éviter ces inconvénients nous introduisons la solution éthérée au moyen d'un tube à entonnoir, muni d'un robinet, dont l'extrémité inférieure est étirée et plonge au fond du tube à essai. Celui-ci est chauffé vers 60-80° dans un bain d'huile. La solution éthérée est filtrée sur un coton et on règle son écoulement au moyen du robinet, de façon qu'il ne s'en accumule pas plus d'un cmc. dans le fond du tube. De cette manière l'évaporation de l'éther se fait rapidement et sans projections.

Il faut avoir soin de ne pas dépasser notablement la température indiquée. Nous avons constaté en effet que l'évaporation brusque de l'éther peut provoquer des pertes de barbiturique par entraînement, même à des températures bien inférieures à celles utilisées pour la sublimation. Enfin, aux températures trop élevées, on risque de produire une sorte de « cracking » des lipides dont les produits de décomposition forment un enduit sur les parois du tube et gênent le dépôt ultérieur du produit sublimé.

Le tube est desséché à l'étuve à 90°, ou mieux encore dans le vide sulfurique. Il est ensuite étiré dans son tiers supérieur à la flamme du chalumeau, de façon à présenter un rétrécissement capillaire de quelques centimè-

tres. A son extrémité ouverte on adapte un bouchon de caoutchouc, traversé par un tube de verre. Celui-ci est mis en relation avec une trompe à eau de manière à obtenir un vide de 10 à 12 mm. de mercure. On coupe alors le tube au moyen du chalumeau dans sa portion étirée. Le tube ainsi fermé est chauffé au bain d'huile, ou au bain de sable, où on le plonge verticalement jusqu'aux deux tiers de sa longueur, l'extrémité effilée se trouvant à l'air. Le chauffage doit être mené très doucement et la température maintenue à environ 160° pendant trois heures au moins. Ces conditions sont nécessaires pour l'obtention de cristaux bien formés.

Dans le cas de produits particulièrement impurs, il est nécessaire de pratiquer une deuxième sublimation. On coupe alors le tube au-dessous du produit sublimé et on brise sa pointe. Le tube ainsi ouvert est appliqué sur le dispositif précédemment décrit pour l'introduction de la solution étherée. On dissout avec un peu d'éther le produit sublimé qui s'écoule par le tube à entonnoir dans un nouveau tube destiné à la seconde sublimation ; celle-ci sera pratiquée comme il est dit plus haut.

Si l'on désire peser le produit sublimé, on lave soigneusement l'extérieur du tube à l'éther, on le dessèche au dessiccateur et on le coupe comme ci-dessus. Il est alors pesé avec soin à la microbalance. Le produit est soumis aux épreuves d'identification, puis enlevé par lavage à l'éther. Le tube restant, après nouvelle dessiccation, est pesé à la microbalance. La différence entre les deux pesées donne le poids du sublimé.

Nous avons pratiqué l'identification des produits sublimés :

- 1° Par l'examen à la loupe des cristaux et comparaisons avec ceux donnés dans les mêmes conditions par des produits connus ;

2° Par détermination du point de fusion instantanée au bloc de Maquenne ;

3° Par la réaction microchimique de Denigès (1).

Nous faisons remarquer que la forme des cristaux obtenus, et même le point de fusion, peuvent varier notablement pour une même substance. Fischer et Kofler [22] ont décrit récemment le polymorphisme du véronal sublimé et indiquent qu'il se présente sous trois formes différentes. Une étude cristallographique des trois formes a montré que la proportion de celles-ci dépend des conditions dans lesquelles a été effectuée la sublimation. Mais, de toutes façons, les trois formes se retrouvent dans presque tous les produits sublimés. L'une des formes en particulier possède un point de fusion de 184°, donc notablement différent de celui habituellement indiqué pour le véronal (191°). Il est probable que des faits analogues se produisent pour le gardénal et nous avons, au cours de nos expériences, rencontré quelquefois des cristaux de ce produit dont le point de fusion s'éloignait du chiffre normal (170°-172°).

e) Réactions d'identification des dérivés barbituriques.

Il a été proposé, pour la caractérisation des barbituriques, de nombreuses réactions de valeur très diverse. Nous nous bornerons à signaler uniquement ici les plus importantes et principalement celles, susceptibles d'application toxicologique, que nous avons utilisées pour l'identification des résidus d'extraction.

La réaction de W. Parri [56] s'opère avec 10 cgr. de produit dissous dans 5 cmc. d'alcool à 90° additionnés de X gouttes de solution d'azotate de cobalt, puis goutte à goutte d'ammoniaque. Il se produit, en présence du véro-

1. Voir p. 43.

nal et des corps analogues, une coloration rouge violacée intense. Nous avons pratiqué quelquefois cette réaction sur les barbituriques extraits des urines et nous avons observé qu'avec de faibles doses de toxique elle manquait de netteté. Paget et Desodt [54] l'ont modifiée légèrement et rendue plus sensible en opérant en présence de cyanure de potassium. Zwikker [87] en a proposé également une nouvelle technique qui a été elle-même mise au point par K. Bodendorf [2]. On dissout 5 mgr. de produit dans 1 à 2 cmc. d'alcool pur et on ajoute 1/2 cmc. de solution à 1 % de nitrate de cobalt dans l'alcool, puis 1/2 cmc. de solution à 1 % de potasse. Il se produit immédiatement, en présence de dérivés barbituriques, une coloration rouge violacée qui dure plusieurs heures. Cette technique nous a donné d'assez bons résultats pour les doses de l'ordre du milligramme. Elle permet de déceler l'existence de dérivés barbituriques dans un résidu.

Obtention des dérivés xanthylés. — Chaque fois que la quantité de dérivés barbituriques extraits est suffisante, il y a intérêt, pour l'identification du produit, à préparer le dérivé xanthylé selon la technique indiquée par M. Fabre [17]. L'isolement du produit à l'état cristallisé et la détermination de son point de fusion permettent de déterminer avec certitude l'hypnotique auquel on a affaire. D'ailleurs, les xanthylés régénérant par l'hydrolyse le barbiturique qu'ils contiennent, on pourra, sur le produit isolé dans cet état, pratiquer d'autres réactions spécifiques.

Réaction microchimique de Denigès [8]. — Parmi les réactions microchimiques proposées pour les barbituriques, nous avons donné, ainsi que beaucoup d'autres auteurs, la préférence à la réaction microchimique de Denigès à cause de la commodité de son exécution et la

netteté de ses résultats. Cette réaction se pratique de la manière suivante : Quelques parcelles (une fraction de mgr.) du produit à identifier, sont rassemblées au centre d'une lame de verre et pulvérisées, si elles ne le sont déjà, avec la pointe d'un agitateur en verre ; sur le petit amas ainsi formé, on ajoute une gouttelette d'ammoniaque dans laquelle le produit se dissout rapidement après mélange avec une baguette de verre.

On aura soin dans ce délayage de ne pas étendre la préparation sur le verre ou de le faire le moins possible en lui laissant un diamètre ne dépassant pas 7 à 8 mm.

Puis on porte au centre de la préparation, une gouttelette d'acide sulfurique dilué au dixième, en volume, que selon les cas, on laissera diffuser ou on mélangera avec une baguette de verre. Cela fait, sans recouvrir la préparation d'une lamelle de verre, on l'examinera directement au microscope à un grossissement d'environ 60 diamètres.

Suivant la nature du dérivé barbiturique examiné, on obtient des cristaux caractéristiques dont les formes ont été décrites par l'auteur et qui peuvent au besoin être comparées avec celles fournies par des préparations de composition déterminée. Cette méthode nous a permis d'identifier les dérivés barbituriques dans les résidus d'extraction de l'éther acide et surtout dans les produits obtenus par microsublimation. Dans ce cas, où nous devons opérer sur des traces de produits, la réaction microchimique nous a paru le seul procédé, à la portée de tous les laboratoires, qui permet la caractérisation du toxique.

Réactions spécifiques. — Diverses réactions ont été décrites pour l'identification de certains dérivés barbituriques. Elles sont généralement applicables sur les produits extraits de viscères. Citons : la réaction de

Lagarce [42] pour le dial, la réaction de Guerbet-Clark et celle de Ranwez [61] qui s'appliquent à tous les dérivés barbituriques possédant un reste de phényle, et en particulier au gardénal.

Au cours de nos essais sur la décomposition des barbituriques en milieu alcalin, nous avons été amené à constater que, dans certaines conditions, l'action de la potasse en fusion permettait de caractériser certains d'entre eux.

On sait depuis longtemps que sous l'action de cet alcali les dérivés barbituriques dégagent de l'ammoniaque, mais si l'on poursuit la chauffe jusqu'à élimination de la totalité de l'eau pour arriver à la fusion alcaline, les réactions énergiques qui se produisent dans ces conditions donnent naissance, pour certains produits, à des corps odorants caractéristiques. Pour le gardénal, par exemple, si l'on chauffe dans un tube à essai 1 mgr. du produit, avec une trace d'eau et 1 ou 2 pastilles de potasse, il se produit d'abord une liquéfaction de l'ensemble avec léger dégagement d'ammoniaque (perceptible au réactif de Nessler). Quand la majeure partie de l'eau est chassée, le liquide resté dans le fond du tube présente une ébullition tranquille et se recouvre de gouttelettes huileuses. On perçoit alors, à l'orifice du tube, une odeur aromatique agréable très intense et persistante. Pour la production de cette odeur il est indispensable que la chauffe ait été poursuivie suffisamment longtemps pour arriver à la fusion de la potasse.

Divers essais nous ont permis de constater que cette odeur était encore nettement perceptible avec des quantités de gardénal de l'ordre du cinquième de mgr. Nous avons appliqué cette réaction, avant d'autres, à un extrait urinaire toxicologique, elle s'est montrée nettement positive et a été confirmée par les recherches ultérieures. Elle nous semble donc présenter un intérêt réel pour l'identi-

fication toxicologique d'un des barbituriques les plus fréquemment utilisés par les désespérés.

Cette réaction est également fournie par le rutonal, phénylméthylmalonylurée et par le prominal ou isonal, n-méthyl-phényléthylmalonylurée. Cela s'explique par la présence, dans les trois dérivés donnant la réaction, d'un reste phényle fixé sur un carbone quaternaire et qui serait à la base du produit odorant caractéristique.

Dans les mêmes conditions le véronal ne donne aucune odeur notable. Le sonéryl au contact de la potasse en fusion dégage une légère odeur qui rappelle celle des alcools supérieurs. Le dial dans la même réaction produit un dégagement de vapeur assez irritante et semblant formée de dérivés allyliques. Mais, dans aucun cas, les odeurs observées ne peuvent être confondues avec le parfum intense et agréable fourni par le gardénal et les corps de la même série. C'est pourquoi nous croyons utile d'indiquer cette réaction très simple à effectuer.

Plusieurs auteurs, et en particulier Jorissen [31], ont déjà signalé l'action de la potasse sur les dérivés barbituriques et une odeur d'acide gras se produisant par acidification de la solution aqueuse obtenue. Les conditions de leurs expériences semblent différentes des nôtres où l'action de la potasse est poursuivie jusqu'à élimination totale de l'eau des réactifs.

CHAPITRE III

Méthodes d'extraction des barbituriques des viscères.

a) Méthode d'Ogier-Kohn-Abrest.

Nous avons utilisé la technique, décrite dans le *Traité de toxicologie* de MM. Ogier et Kohn-Abrest, qui comprend les opérations suivantes : la pulpe d'organes est introduite dans un ballon avec une fois et demi son volume d'alcool à 90° et environ 1 % d'acide tartrique, de façon à rendre le milieu franchement acide au tournesol. Le mélange est mis à digérer pendant 12 heures à 50-60°, puis refroidi et filtré. Le résidu est soumis à l'action de la presse et le liquide qui s'écoule est passé également sur le filtre. Pour achever l'épuisement du résidu, il est recommandé de l'imbiber d'un peu d'alcool et de le soumettre de nouveau à l'action de la presse. Dans les essais que nous avons effectués à la méthode d'Ogier, nous avons toujours pratiqué deux reprises par l'alcool du résidu d'épuisement, de manière à assurer une extraction aussi complète que possible du toxique recherché.

Les liqueurs alcooliques, réunies, ont un titre voisin de 70°, elles sont fortement colorées et contiennent des substances extractives diverses dont l'élimination est indispensable. Pour la réaliser, nous avons, selon la technique d'Ogier, pratiqué des reprises successives par l'alcool.

Pour cela la liqueur alcoolique d'extraction est distillée

dans le vide, dans l'appareil décrit par les auteurs, jusqu'à consistance sirupeuse. On introduit alors dans le ballon un volume d'alcool à 95° égal au volume primitif; il se forme un abondant précipité qui s'agglomère par le repos et le refroidissement. Par filtration on obtient une liqueur limpide, peu colorée, qui est à nouveau distillée dans le vide. Le résidu est repris comme précédemment par l'alcool à 95°, ce qui produit un précipité et donne, après filtration, une nouvelle liqueur dont on opère de même la concentration. Ce dernier extrait est repris par l'alcool absolu, le filtrat est encore une fois amené à consistance d'extrait par distillation dans le vide, on vérifie qu'il ne précipite plus par l'alcool absolu et on le reprend par 100 cmc. d'eau. Les dernières traces d'alcool sont chassées en distillant quelques cmc. de la solution aqueuse et on a finalement une solution tartrique contenant les poisons organiques.

Ce liquide est épuisé à trois reprises par l'éther de pétrole, puis par l'éther sulfurique bien exempt d'alcool. La distillation de ce dernier solvant donne un extrait correspondant à « l'éther acide » et qui contient les dérivés barbituriques. Dans le cas où l'on a à rechercher un alcaloïde, la solution tartrique est alcalinisée par un bicarbonate alcalin, puis traitée à nouveau par l'éther, à trois reprises, qui enlève la plupart des alcaloïdes et dont l'action dissolvante est complétée par des agitations répétées avec le chloroforme ou l'alcool amylique pour extraire la totalité de la strychnine et la morphine.

RÉSULTATS FOURNIS PAR LA MÉTHODE DE STAS-OTTO,
MODIFIÉE PAR OGIER ET KOHN-ABREST.

Nous avons opéré sur des viscères additionnés de quantités connues de véronal.

I. — Expériences avec des viscères frais.

Première expérience. — A 100 gr. de foie de bœuf, haché, placé dans un ballon, on ajoute 5 cgr. de véronal en solution aqueuse et on maintient quelques heures à la température du laboratoire, en agitant fréquemment pour homogénéiser la masse. On pratique alors l'extraction, suivant la technique décrite par Kohn-Abrest, et on obtient, à partir de « l'éther acide », un résidu jaunâtre, cristallisé, du poids de 53 mgr. qui est soumis à la purification par le charbon. Finalement nous obtenons 37 mgr. de véronal incolore et bien cristallisé.

Rendement : 74 %.

Deuxième expérience. — A 100 gr. de cervelle de mouton, convenablement pulpée, on ajoute, en triturant dans un mortier, 5 cgr. de véronal en solution aqueuse. Après 5 heures de séjour à la température du laboratoire, on pratique l'extraction et la purification comme dans l'expérience précédente.

Véronal extrait : 31 mgr.

Rendement : 62 %.

Troisième expérience. — Dans les mêmes conditions que précédemment, nous pratiquons l'extraction sur 100 gr. de sang humain, contenant 5 cgr. de véronal.

Véronal extrait : 40 mgr.

Rendement : 80 %.

Quatrième expérience. — 100 gr. de sang humain additionnés de 50 mgr. de véronal donnent à l'extraction :

Véronal : 32 mgr.

Rendement : 64 %.

II. — Expériences avec des viscères putréfiés.

Première expérience — A 100 gr. de foie de bœuf, ayant subi une putréfaction avancée (par plusieurs jours de séjour à l'étuve à 37°), on ajoute 50 mgr. de véronal en solution aqueuse et on pratique l'extraction comme précédemment.

Véronal trouvé : 37 mgr.

Rendement : 74 %.

Deuxième expérience. — 100 gr. de cervelle de mouton putréfiée, additionnée de 50 mgr. de véronal.

Véronal extrait : 27 mgr.

Rendement : 54 %.

Troisième expérience. — 50 gr. de sang humain putréfié, additionnés de 25 mgr. de véronal, donnent :

Véronal extrait : 19 mgr.

Rendement : 76 %.

Les résultats de ces expériences peuvent se résumer dans le tableau suivant :

Organes contenant 50 milligr. de véronal pour 100 gr.			
Viscères frais		Viscères putréfiés	
Organe ou tissu	Rendement %	Organe ou tissu	Rendement %
Foie.....	74	Foie.....	74
Cervelle.....	62	Cervelle.....	54
Sang.....	80	Sang.....	76
Sang.....	64		

NOTE. — Dans toutes ces expériences nous avons suivi strictement la technique d'Ogier et de Kohn-Abrest, sauf pour les extraits de cervelle de mouton qui donnaient lors de l'agitation avec l'éther de pétrole des émulsions stables arrêtant l'opération. Pour détruire ces émulsions nous avons ajouté du sulfate d'ammonium au liquide

aqueux, chauffé pour chasser l'éther de pétrole qu'il contenait. Il se forme alors un précipité et après filtration la solution se prête à l'agitation avec l'éther de pétrole, sans danger d'émulsion.

CONSIDÉRATIONS SUR LA MÉTHODE D'OGIER-KOHN-ABREST.

Nous avons observé au cours de l'emploi de la méthode d'Ogier-Kohn-Abrest divers inconvénients que nous voulons signaler ici :

La filtration de la première solution alcoolique est généralement très lente et le liquide d'expression, obtenu ensuite, offre encore de plus grandes difficultés pour sa clarification.

Lors de la distillation de la première solution alcoolique, il se produit toujours une mousse abondante, surtout lorsque l'extraction a été pratiquée sur des organes riches en lipides, comme le cerveau, ou sur des viscères putréfiés. La même difficulté se rencontre dans la dernière distillation, quand, après avoir repris par l'eau le résidu alcoolique, on chasse les traces d'alcool que pouvait contenir la solution.

L'inconvénient, à coup sûr le plus sérieux de la méthode, est constitué par les émulsions, si souvent observées par les expérimentateurs, qui se produisent pendant l'épuisement de la solution aqueuse par les solvants volatils. Nous avons été gênés par ces émulsions, malgré l'usage des artifices habituels en pareil cas, dans l'extraction des viscères putréfiés et du cerveau, malgré des purifications à l'alcool absolu très poussées. D'ailleurs, dans tous les cas, nous avons constaté que la solution aqueuse finale était fortement trouble et contenait parfois un précipité abondant.

Les rendements que nous avons obtenus par la méthode de Stas-Otto sont, comme on a pu le voir, assez variables

et peu satisfaisants. Si l'on analyse les causes de déficit, on entrevoit :

1° Un épuisement incomplet de la masse viscérale. Le résidu assez abondant du traitement par l'alcool étant susceptible de retenir des quantités non négligeables de toxiques, malgré les lavages et expressions auxquels il est soumis ;

2° Des pertes diverses au cours des précipitations et des filtrations qui font partie de la purification de l'extrait alcoolique. Il est difficile, en effet, étant donné la nature des précipités, de réaliser un lavage efficace ;

3° Les émulsions tenaces qui se forment lors de l'épuisement par les solvants volatils empêchent une séparation rigoureuse des liquides en présence et causent certainement des pertes très notables ;

4° Si l'on pratique, comme l'indique Kohn Abrest, l'épuisement à l'éther de pétrole, pour enlever les lipides qui souillent la solution aqueuse, on risque, en plus d'une émulsion, d'entraîner par ce solvant des quantités non négligeables de barbituriques. Nous avons constaté, en effet, que la solubilité de ces corps dans l'éther de pétrole, rectifié entre 40 et 60°, était de l'ordre de un mgr. pour 100 cmc. ;

5° Si, pour éliminer la plus grande partie des impuretés, en suspension dans la solution aqueuse acide, on filtre celle-ci sur un filtre mouillé, on risque de laisser sur le filtre, et dans le ballon où s'est effectuée la reprise par l'eau, des substances ayant retenu des barbituriques. Les corps éliminés dans cette phase de l'opération sont en effet constitués, pour la majeure partie, de lipides insolubles dans l'eau. Or les barbituriques possèdent un coefficient de partage très notable entre l'eau et les lipides. Il peut donc se produire, si la quantité d'eau n'est pas très grande par rapport à la dose de barbi-

turiques, une fixation de ceux-ci dans les lipides éliminés.

Nous avons pu vérifier, par la méthode suivante, la présence de dérivés barbituriques dans les corps insolubles restés sur le filtre et dans le ballon. Pour cela nous avons dissous ces produits dans l'éther et la solution éthérée a été agitée dans une ampoule à décantation, à plusieurs reprises, avec une solution de sulfate d'ammonium légèrement ammoniacale. Cette solution soutirée est acidifiée et épuisée par l'éther. Dans le résidu de distillation de l'éther nous avons pu, après purification et microsublimation, caractériser les dérivés barbituriques.

Des impuretés lipidiques, provenant de 200 gr. d'organes qui avaient été additionnés de 100 mgr. de véronal, et traités ensuite par la méthode classique d'Ogier-Kohn-Abrest, il nous a ainsi été possible d'obtenir 9 mgr. de véronal qui avait échappé à l'extraction antérieure.

Malheureusement, l'épuisement par une solution alcaline des lipides n'est pas toujours possible, très souvent cette opération provoque des émulsions irréductibles et, enfin, le traitement des barbituriques en milieu alcalin n'est pas sans inconvénient, comme nous l'avons indiqué.

La méthode d'Ogier-Kohn-Abrest présente également l'inconvénient de nécessiter l'emploi de quantités fort importantes d'alcool.

Pour un kgr. de viscères il faut : 1.500 cmc. d'alcool à 90°, 2 à 3 litres d'alcool à 95° et 350 à 700 cmc d'alcool absolu. Dans un laboratoire effectuant de nombreuses expertises, une grande partie de ces solvants peut être récupérée et utilisée à nouveau ; mais le procédé reste assez onéreux.

b) Méthodes à l'acide trichloracétique.

En 1927, M. G. Florence [25] a proposé une méthode d'extraction des alcaloïdes basée sur un principe nouveau : la précipitation des albumines par l'acide trichloracétique et la formation, par cet acide, de sels solubles avec les alcaloïdes (et diverses bases organiques telles que l'aniline). Dans l'esprit de l'auteur cette méthode était destinée à remplacer, dans nombre de recherches, la méthode de Stas-Olto, trop longue et trop délicate, ne fournissant qu'avec de grosses difficultés des produits d'extraction très purs.

L'acide trichloracétique a l'avantage d'être un des rares réactifs précipitant les albumines, sans jouer, aux concentrations envisagées, le même rôle vis-à-vis des alcaloïdes ; son emploi, depuis Moog, est courant en chimie biologique comme déféquant des liquides albumineux.

Les recherches de M. G. Florence comportaient deux parties :

- 1^o Une étude des trichloracétates d'alcaloïdes qui ont une solubilité dans l'eau généralement supérieure à 2 % et sont parfois très bien cristallisés ;
- 2^o Un exposé des méthodes de recherche des alcaloïdes dans le lait, le sang, les viscères.

Voici la méthode proposée :

« ...300 gr. de viscères, finement broyés au hache-viande
« américain, sont additionnés petit à petit, dans un mor-
« tier de 200 gr. d'acide trichloracétique à 20 %. On
« malaxe au pilon jusqu'à ce que toute la portion albumi-
« noïde soit coagulée, ce qui se reconnaît facilement à la
« coloration de l'ensemble qui prend un aspect gris sale.
« On porte dans un ballon au bain marie et on essore, Le

« filtrat est parfaitement limpide. Cependant, si la masse
« des viscères contenait une grande portion de tissu hépa-
« tique, il peut arriver que le filtrat soit légèrement
« coloré en jaune ou soit opalescent. Le coagulum, resté
« sur l'essoreuse, est repris dans le mortier avec 100 cmc.
« d'acide trichloracétique à 5 % et épuisé ensuite dans un
« presse-viande. On réunit les filtrats qui sont limpides.

« La solution acide est épuisée d'abord par l'éther de
« pétrole léger, puis par l'éther. Cet épuisement doit être
« renouvelé deux ou trois fois. Dans les résidus de l'éva-
« poration de l'éther acide, obtenus suivant la technique
« habituelle, on trouve : les glucosides, digitaline, stro-
« phantine et les barbiturates : véronal, etc. Ces résidus
« ainsi obtenus sont purs du premier jet et sont même
« directement pondérables ».

Les alcaloïdes sont extraits ensuite par l'éther et le chloroforme dans la solution alcalinisée par le bicarbonate de potassium. G. Florence indique avoir obtenu un rendement de 89 % dans une extraction de strychnine et 84 % pour du véronal. Mais il faut tenir compte que les doses employées étaient considérables, bien supérieures aux doses habituelles, puisqu'il y avait 0 gr. 121 de strychnine dans 200 gr. d'organes et 0 gr. 110 de véronal dans 100 cmc. de sérum de cheval.

Cette méthode présente certainement l'avantage d'une assez grande simplicité et d'une exécution rapide. Elle a fait l'objet de critiques de la part de plusieurs auteurs, en particulier de Joanid [30], qui a comparé les résultats obtenus sur des viscères, additionnés de toxiques ou provenant d'animaux intoxiqués, par la méthode classique de Stas-Otto Ogier et par la méthode à l'acide trichloracétique. Le premier procédé lui a fourni le meilleur rendement. Il reproche d'autre part à la méthode de Florence de conduire à des volumes de liquides aqueux importants, dont l'épuisement est assez laborieux, d'au-

tant plus que les émulsions sont encore assez fréquentes.

Un autre auteur, Schoops [64], a appliqué la méthode à l'acide trichloracétique à la recherche de la gènesérine puis de la strychnine [65] avec de bons résultats ; mais il a renoncé à généraliser la méthode, parce qu'il a constaté [67] que l'acide trichloracétique précipite certains alcaloïdes : delphinine à 1 pour 10.000 et émétine à 1 pour 5.000 ; la narcotine, la papavérine, la vératrine aux concentrations de 1 p. 1.000.

Vitte [84] a utilisé l'acide trichloracétique pour la recherche des dérivés barbituriques dans la substance cérébrale de chiens intoxiqués par le véronal et le gardénal. Voici la technique qu'il y a suivie : « La substance « cérébrale de l'animal (dont le poids est voisin de 100 gr. « si l'animal est de bonne taille) est triturée au mortier « de façon à obtenir une pâte sans grumeaux. Ajouter « ensuite 5 cmc. de la solution d'acide trichloracétique à « 20 % ; triturer quelques instants jusqu'à obtention d'une « masse homogène. Verser de nouveau 5 cmc. de la solu- « tion précédente et agiter comme il vient d'être dit ; con- « tinuer ainsi l'opération chaque fois avec 5 cmc. jusqu'à « concurrence de 100 cmc. environ. En opérant ainsi, on « obtient une masse fluide très divisée et la dissolution « du toxique se fait dans les conditions les plus favo- « rables. Au bout d'une demi-heure ajouter 50 cmc. d'eau ; « agiter la masse quelques instants, laisser ensuite en « contact au moins une demi-heure en remuant de temps « en temps. Filtrer. On obtient ainsi un liquide limpide ».

« L'extraction se fait avec environ 100 cmc. d'éther en « ajoutant le liquide contenant le toxique par petites por- « tions (30 à 40 cmc. chaque fois). Filtrer l'éther et évaporer.

« *Purification.* — Le résidu est dissous dans l'eau légè- « rement ammoniacale. On ajoute une petite pincée de noir « animal et on porte au bain-marie 1/4 d'heure environ.

« On le reprend par l'eau ammoniacale et on filtre. On acidifie (au tournesol) et on extrait à nouveau par l'éther. »
« On obtient un produit assez pur pour le caractériser. »

Par cette méthode, Vitte a retrouvé le gardénal et le véronal dans le cerveau de chiens ayant reçu 0 gr. 20 par kgr. de ces toxiques. L'identification a été faite par la réaction de Denigès. L'auteur admet qu'il doit y avoir extraction incomplète et ne donne pas d'indications sur le rendement. Il préconise cette méthode à cause de sa rapidité et de la simplicité des manipulations, qui permettent d'obtenir un produit assez pur pour se prêter à la caractérisation par les méthodes classiques.

Nous avons pratiqué quelques essais d'extraction de barbituriques par le traitement de viscères à l'acide trichloracétique suivant les techniques de Florence et de Vitte et nous avons constaté divers inconvénients. Le résidu du traitement par l'acide trichloracétique est très abondant et difficile à épuiser complètement sans obtenir un volume de solution aqueuse considérable et risquant d'entraîner une quantité importante d'impuretés. L'épuisement de cette solution par l'éther est assez long et occasionne souvent des émulsions tenaces ; d'autre part, l'éther entraîne toujours une certaine quantité d'acide trichloracétique qui vient souiller le résidu de barbituriques et dont il est assez difficile de se débarrasser. Le même fait a été observé par Schoops [66] qui a retrouvé ce produit dans l'éther acide et l'élimine par contact de la solution avec du carbonate de potassium. Nous avons pu également séparer le véronal de l'acide trichloracétique en reprenant le résidu de l'éther acide par l'eau, neutralisant au carbonate de soude et épuisant la solution par l'éther suivant une variante de la méthode de purification des barbituriques imaginée par Weiss [85]. La présence de l'acide trichloracétique dans les extraits étherés a encore l'inconvénient d'exposer les produits à diverses altérations

de la part de ce réactif dont l'activité chimique n'est pas négligeable. Enfin, le rendement de ce procédé d'extraction des barbituriques nous a paru très défectueux. Florence annonce un rendement de 84 %, mais il a opéré sur un liquide peu complexe : le sérum de cheval, et il avait utilisé une dose importante de barbituriques : 110 mgr.

Voici les résultats que nous ont fournis les méthodes à l'acide trichloracétique.

MÉTHODE DE FLORENCE.

Sur 100 gr. de sang additionnés de 50 mgr. de véronal l'extraction pratiquée selon la technique de l'auteur fournit un résidu chargé d'acide trichloracétique, qui, après purification, pèse 11 mgr.

Rendement 22 %.

MÉTHODE DE VITTE.

Premier essai : cervelle de mouton putréfiée : 100 gr.

Véronal : 50 mgr.

Extraction et purification selon la technique de Vitte : véronal extrait : 14 mgr. 5.

Rendement : 28 %.

Deuxième essai : cervelle de mouton putréfiée : 100 gr.

Véronal : 1 mgr.

Après purification il n'a pas été possible de caractériser le véronal par la réaction de Denigès dans l'extrait obtenu.

En résumé : les méthodes à l'acide trichloracétique peuvent convenir pour la recherche de certains toxiques dans les produits biologiques ; c'est ainsi que Florence a appliqué avec succès sa technique à la recherche de l'aniline. Mais pour les alcaloïdes et les glucosides elles exposent à des pertes par précipitation, adsorption ou altération ; pour les barbituriques enfin, nous avons constaté que l'obtention d'un produit pur est délicate et le rendement défectueux.

c) Méthodes par protéolyse.

Les difficultés d'application de la méthode de Stas-Otto ont conduit M. Fabre à imaginer une méthode entièrement nouvelle, consistant dans la protéolyse des organes par la pancréatine. Il obtient ainsi un liquide aqueux, contenant en dissolution les toxiques qui seront extraits directement par les solvants. Cette méthode, très ingénieuse, a été appliquée par M. Fabre à ses recherches sur la localisation des barbituriques avec un plein succès. La technique [14] qu'il a employée est la suivante :

« Les organes, convenablement pulpés, sont délayés
« dans cinq parties d'eau distillée et le mélange est porté
« à l'ébullition quelques instants. On laisse refroidir à
« 50-55° et le produit, transvasé dans un flacon à large
« ouverture, est soumis à l'action de la pancréatine,
« ajoutée au mélange dans la proportion de 1 gr. pour
« 50 gr. de pulpe. Après un séjour de 10 à 12 heures à
« l'étuve à 50-55° la protéolyse est pratiquement com-
« plète. On porte à l'ébullition et on sépare le résidu par
« centrifugation ou filtration. Le liquide ainsi obtenu,
« parfaitement limpide, est traité en milieu acide par
« l'éther, soit par agitation, soit au moyen de l'appareil
« à épuisement continu de MM. Fayolle et Lormand,
« sans qu'il y ait à craindre d'émulsions tenaces comme
« on en observe fréquemment au cours de semblables
« manipulations. Par distillation du solvant on obtient en
« général un résidu cristallisé, d'une pureté telle qu'il
« peut être soumis directement à l'action des réactifs
« caractéristiques des produits étudiés.

« Dans le cas de différents viscères, et du sérum san-
« guin en particulier, l'ébullition précédant l'action de la
« pancréatine est nécessaire afin de détruire l'antitrypsine
« qui s'opposerait à la protéolyse. »

M. Fabre s'est assuré que l'action de la pancréatine ne provoquait aucune modification des propriétés physiques et chimiques du véronal et des principaux alcaloïdes pouvant être recherchés en toxicologie. Le rendement de la méthode est excellent pour les dérivés barbituriques. Il peut atteindre, dans les opérations menées soigneusement, 90 % et se trouve par suite bien supérieur à celui fourni par la méthode d'Ogier, qui, nous l'avons vu, est fréquemment compris entre 60 et 80 %. Ces résultats ont été obtenus même sur des viscères putréfiés, fournissant des milieux de pH 6,6 à 8,5.

En général, pour éviter un développement de la putréfaction pendant le séjour à l'étuve, il est bon d'ajouter quelques centimètres cubes de toluène à la bouillie viscérale.

Quelques difficultés se présentent dans le cas d'organes riches en lipides, tels que le cerveau, qui fournissent des liquides de digestion, troubles, pour lesquels il est nécessaire de faire un épuisement par le chloroforme en milieu acide pour éliminer les causes d'émulsion.

Plusieurs points de cette technique doivent être suivis très soigneusement, si l'on veut obtenir de bons résultats. La pancréatine doit être d'activité contrôlée, employée en quantité suffisante, et le séjour à l'étuve gagne à être prolongé, tout en maintenant rigoureusement la température optima de 50°. L'ébullition préalable, destinée à détruire l'antitrypsine, est toujours utile et indispensable avec le sang.

Si l'on a soin, comme le recommande M. Fabre, de faire bouillir le liquide avant la filtration, celle-ci est bien facilitée et l'épuisement ultérieur par les solvants se fait mieux. Pour cet épuisement on a intérêt à employer les appareils à fonctionnement continu. Malheureusement beaucoup de laboratoires ne possèdent pas d'appareils de ce genre de dimensions suffisantes. Afin de permettre

l'épuisement dans une ampoule à décantation, sans risque d'émulsion, Lagarce [43] a indiqué de saturer le liquide de digestion avec du sulfate d'ammonium. L'emploi de ce sel ou d'autres sels neutres : chlorure de sodium, etc., favorise nettement les extractions.

Nous avons tenté d'appliquer au liquide de digestion a défécation au sous-acétate de plomb, qui réussit bien pour les urines contenant des barbituriques. Le liquide ainsi déféqué, débarrassé du plomb en excès par l'acide sulfurique, est limpide, incolore, et peut être agité sans émulsions avec les solvants. Mais le précipité abondant, qui se forme au cours de la défécation, entraîne vraisemblablement une quantité importante de dérivés barbituriques et le rendement est mauvais, comme le montre le compte rendu de l'expérience suivante.

Un échantillon de sang de 115 gr. a été additionné de 50 mgr. de véronal, puis de trois fois son volume d'eau et le mélange a été chauffé dix minutes à 100°. Après refroidissement il a été traité par 8 gr. de pancréatine et placé à l'étuve à 50° où il a été maintenu 24 heures. Le liquide est alors porté à l'ébullition et filtré. Le filtrat limpide est additionné du dixième de son volume de sous-acétate de plomb liquide. Après agitation et quelques minutes de contact on filtre. Le filtrat est additionné de solution saturée de sulfate de sodium et acidifié par l'acide sulfurique dilué. Une nouvelle filtration donne la liqueur propre à l'extraction à l'éther. Celle-ci est réalisée dans une ampoule à décantation. L'éther séparé, desséché sur le sulfate de sodium anhydre, donne par évaporation un résidu cristallisé, légèrement impur, qui, après action du charbon, fournit le produit incolore et convenablement purifié. En tenant compte des différentes dilutions et des volumes recueillis à la filtration, on calcule que ce résidu correspond à 26 % du véronal de la prise d'essai.

Il ne paraît donc pas utile d'appliquer une telle méthode

de défécation qui complique les opérations sans donner toute satisfaction. Il semble préférable de s'en tenir au procédé décrit par M. Fabre.

Le principe de la méthode de digestion pancréatique a été repris, en 1931, par un auteur allemand W. Koll [40], qui paraît d'ailleurs avoir ignoré le travail de M. Fabre. Koll utilise, pour la recherche de la strychnine dans les organes, la digestion de ceux-ci par la pepsine et la trypsine entérokinase dans un milieu convenablement « tamponné ». Dans le liquide obtenu il extrait la strychnine par épuisement au chloroforme en *milieu fortement chlorhydrique*. Il prétend, de cette manière, éviter les pertes qui, dans les procédés d'extraction du type Stas-Otto, résultent :

- 1° De la fixation de la strychnine par les matières protidiques ;
- 2° De l'adsorption de l'alcaloïde par les filtres ;
- 3° Des opérations de purification nécessaires avec les méthodes ordinaires.

D'après Koll la méthode par digestion fournit un rendement de 90 % pour 2 mgr. de strychnine contenue dans 100 gr. d'organes, alors que la méthode de Stas Otto ne donne, dans les mêmes conditions, que 15 à 40 % de l'alcaloïde.

Voici la technique proposée par Koll : 100 gr. d'organes, convenablement divisés, sont délayés dans 200 cmc. d'une solution tamponnée au moyen de citrate, de pH 2,27, contenant 0,4 % de pepsine très active. Le mélange, recouvert d'une légère couche de toluène, est laissé pendant deux jours à l'étuve à 38°. On ajoute alors 200 cmc. d'une solution à 4 % de trypsine dans la soude décinormale et environ 30 cmc. d'extrait de muqueuse intestinale de chien. Le pH est alors environ de 9 et le mélange, toujours recouvert de toluène, est laissé à l'étuve à 38°

pendant deux jours. Le liquide ne renfermant plus en suspension que quelques résidus conjonctifs, est neutralisé par l'acide sulfurique à 10 % et concentré au bain-marie jusqu'à environ 150 cme. Par filtration, sur du coton de verre, il est débarrassé des particules insolubles. Le coton ayant servi à la filtration est lavé à l'acide sulfurique dilué et le mélange est franchement acidifié par 30 cme. d'acide sulfurique à 10 %.

Cette liqueur acide est épuisée pendant trois heures, dans un appareil à extraction continue, par le chloroforme qui entraîne les impuretés lipidiques. La liqueur est ensuite additionnée d'acide chlorhydrique concentré jusqu'à obtention d'une solution chlorhydrique trois fois normale et on reprend l'épuisement au moyen de nouveau chloroforme, pendant huit heures. La strychnine qui est soluble dans ces conditions, à l'état de *chlorhydrate*, dans le chloroforme, passe en partie dans le premier extrait et est totalement enlevée par la seconde opération. Les résidus de distillation des solutions chloroformiques sont purifiés par une méthode basée sur le principe de la solubilité du chlorhydrate de strychnine dans le chloroforme en milieu très fortement chlorhydrique.

Plusieurs points de ce travail présentent un grand intérêt. Nous retiendrons, en particulier, l'hypothèse de la libération par les ferments digestifs des toxiques fixés par les matières protidiques. Koll signale que sa méthode par digestion fournit d'excellents rendements : cela s'explique sans doute par l'extraction totale des toxiques qu'elle permet grâce à la liquéfaction des organes.

La mise en œuvre des méthodes par protéolyse demande un temps assez long, nécessité par l'action fermentaire et par l'épuisement au moyen de l'appareil à extraction continue. Mais cette lenteur est compensée par le petit nombre de manipulations qu'elles comportent, simplification qui contribue certainement à accroître le rende-

ment. Le produit isolé n'est généralement pas assez pur pour être caractérisé directement, mais il est toujours facile de le purifier.

Les méthodes par digestion fermentaire présentent donc un grand intérêt pour les expériences de biologie et de pharmacologie où l'on désire rechercher avec précision la localisation et la répartition d'un poison organique. Leur emploi dans une expertise toxicologique pourrait donner lieu, peut-être, à certaines critiques par suite de l'utilisation d'un réactif biologique dont la composition n'est pas définie. Toutefois, ce réactif pourrait, au préalable, être soumis à des essais montrant qu'il ne peut introduire aucun toxique ni produit similaire (ptomaïne) dans le milieu où s'exerce son action.

*
* *
*

Dans toutes les méthodes d'extraction des poisons organiques la principale difficulté réside dans la résistance à l'épuisement des masses protéiques, viscères ou coagulum sanguin ; c'est d'ailleurs pourquoi la protéolyse donne des résultats si intéressants. Un procédé simple consiste dans la liquéfaction par les alcalis à chaud des tissus et du sang coagulé. Nous avons constaté qu'après un séjour de deux heures au bain-marie en présence de 50 % de lessive de soude et de son volume d'eau distillée, du sang coagulé était transformé en un liquide homogène. Il en est de même pour le foie. Des procédés analogues d'hydrolyse alcaline avaient été déjà proposés ; par Dragendorf, qui employait la potasse, pour la recherche de la cantharidine ; plus récemment, J. Weiss et R. A. Hatcher [85 *bis*] ont utilisé la liquéfaction par la soude à chaud, pour la recherche de la strychnine dans les organes.

Il est bien évident que l'emploi de tels procédés est

limité aux produits toxiques susceptibles de résister à l'action de la soude. Les dérivés barbituriques, en particulier, sont trop sensibles à ce réactif pour pouvoir être recherchés de la sorte. Il serait possible toutefois de mettre au point une technique de ce genre pour les produits caractéristiques de l'hydrolyse des barbituriques en milieu alcalin.

La principale difficulté réside dans l'extraction du toxique du liquide alcalin, très chargé en produits de décomposition des albumines. Nous avons étudié divers procédés de défécation de ce liquide et nous avons constaté que, dans la plupart des cas, le volumineux précipité qui se forme entraîne une grande partie des produits toxiques recherchés. Il en est ainsi, en particulier, pour la défécation au sulfate d'ammonium, en milieu acide et dans la défécation au plomb, également après acidification. Les résultats les meilleurs nous ont paru être fournis par une défécation au chlorure de baryum en milieu chlorhydrique. Pour cela, la solution obtenue par hydrolyse alcaline de 100 gr. de sang coagulé est additionnée de solution de chlorure de baryum à 10 % (90 cmc. environ) et d'acide chlorhydrique en excès. On filtre et dans le filtrat on élimine l'excès de baryum au moyen de sulfate de sodium ajouté sous forme de solution saturée. Le filtrat est limpide et incolore et se prête bien à l'extraction par les solvants volatils. Nous avons pu de la sorte retrouver dans 100 gr. de sang les produits de décomposition de 50 mgr. de véronal qui y avait été ajouté avant l'action de la soude. Ces produits se présentaient sous forme de cristaux presque incolores, rappelant les formes cristallines des dérivés barbituriques, leur point de fusion était de 125° environ.

CHAPITRE IV

Technique d'extraction proposée.

a) Emploi de l'acétone.

Nous avons vu que le procédé classique de Stas-Otto-Ogier-Kohn-Abrest est long, délicat, et fournit un résidu de « l'éther acide » souvent très impur, principalement avec les viscères ayant subi la putréfaction. Dans ce cas aussi on observe fréquemment, lors de l'épuisement par les solvants, des émulsions tenaces, difficiles à résoudre.

Il semble bien que ces émulsions sont dues à l'élimination incomplète des protides et des phospho aminolipides, de type lécithine, qui abaissent la tension superficielle des liquides en donnant des solutions colloïdales. La teneur des organes et des tissus en lécithines est en effet notable (1) et ces substances ne sont pas précipitées, dans la méthode classique, par les traitements successifs à l'alcool. D'autre part, ces lécithines sont susceptibles de donner, avec les protéiques et d'autres corps, des composés d'adsorption stables, dont l'élimination est difficile. Il semble donc d'un grand intérêt, dans une méthode d'extraction, d'éliminer le plus possible les lécithines.

Dans ce but, sur les indications de M. Cheramy [6]

1. Le cerveau humain contient 27,6 de phosphatides totaux pour 100 gr. de matière sèche. Le sang contient 0,12 à 0,14 ‰ de lécithine exprimée en phosphore lipidique.

nous avons utilisé l'acétone, solvant dans lequel les lécithines sont totalement insolubles. On sait également que l'acétone est un très bon agent de précipitation des matières protidiques qui, depuis les travaux de Piettre et Vila [57-58] et de Piettre [59], est fréquemment employé pour les dosages des albumines sériques. Cette étude des conditions d'emploi de l'acétone, nous l'avons effectuée sur des viscères additionnés de barbituriques et de strychnine.

b) Description de la technique.

La technique que nous avons suivie comporte les opérations ci-dessous :

1^o Digestion des viscères avec de l'acétone en milieu acide ;

2^o Après filtration concentration de la solution acétonique par distillation dans le vide jusqu'à consistance d'extrait mou ;

3^o Reprise par l'acétone anhydre ;

4^o Distillation de l'acétone à la pression ordinaire jusqu'à consistance sirupeuse ;

5^o Reprise du résidu par l'eau à chaud, en présence de sulfate d'ammonium. Filtration après refroidissement ;

6^o Extraction par l'éther : « éther-acide » ;

7^o Alcalinisation de la solution aqueuse, épuisement par l'éther : « éther-alcalin. »

NOTE. — Dans certaines opérations, portant sur des viscères riches en lipides, nous avons trouvé bon de pratiquer une reprise par l'eau après la deuxième opération. La solution aqueuse filtrée est distillée dans le vide et son résidu repris par l'acétone, comme il est dit au texte ci-dessus (3^o).

Ces opérations sont conduites de la manière suivante : les viscères, finement divisés, sont introduits dans un ballon et additionnés d'une solution d'acide tartrique à 20 % jusqu'à réaction franchement acide, puis de deux fois et demi leur volume d'acétone rectifié. On adapte au ballon un réfrigérant à reflux et on chauffe pendant 2 heures au bain-marie à 60°. Après refroidissement on filtre le contenu du ballon sur un filtre mouillé à l'acétone. Le contenu du filtre est soumis à l'expression et lavé à l'acétone, l'acétone de lavage étant mis de côté.

Le filtrat est introduit par petites quantités dans l'appareil distillatoire décrit dans le *Traité de toxicologie* d'Ogier et E Kohn-Abrest (t. II, p. 88) et soumis à la distillation dans le vide, sous une pression de 10 à 20 cmc. de mercure environ. Quand tout le premier liquide a distillé, on introduit, de la même manière, l'acétone ayant servi au lavage du ballon du résidu des viscères et du filtre. Finalement la distillation est poursuivie jusqu'à ce que le contenu du ballon atteigne la consistance d'extrait mou.

Cet extrait est dissous à chaud, dans le ballon, dans 200 cmc. au moins d'acétone pure. Cette dissolution est facilitée par une vive agitation et, au besoin, par l'addition de quelques perles de verre. La solution trouble, ainsi obtenue, est refroidie énergiquement, si possible, dans la glace, puis filtrée sur un petit filtre imbibé d'acétone. Le filtrat est reçu dans un ballon contenant quelques perles de verre. Le ballon précédent est lavé avec un peu d'acétone qui est également passé sur le filtre.

La solution acétonique est distillée à la pression normale jusqu'à consistance sirupeuse. Ce résidu est repris par 200 cmc. d'eau et additionné de 20 à 30 gr. de sulfate d'ammonium pur. La solution est chauffée, sous vide, jusqu'à commencement d'ébullition, de manière à chasser les dernières traces d'acétone. Elle est ensuite refroidie

énergiquement, puis filtrée sur un filtre mouillé. Le ballon et le filtre sont lavés avec une solution à 10 % de sulfate d'ammonium.

On vérifie la réaction acide du filtrat et on l'épuise à trois reprises, dans une ampoule à décantation, avec son volume d'éther. Les liqueurs éthérées, réunies dans l'ampoule à décantation, sont lavées avec une petite quantité d'eau distillée, puis desséchées sur le sulfate de sodium anhydre. Le sulfate de sodium est séparé par filtration sur du coton, et l'éther est distillé. Le résidu de la distillation correspond aux produits enlevés par « l'éther acide », et contient les barbituriques.

L'extraction, en milieu alcalin, par l'éther ou les autres solvants, se fait ensuite suivant les techniques usuelles appropriées aux produits recherchés.

Dans le cas d'organes fortement chargés en lipides, nous avons trouvé avantage à introduire dans la technique une reprise par l'eau du résidu de distillation de la première solution acétonique, qui, habituellement, est effectuée au moyen d'acétone pure.

Pour cela, après élimination de l'acétone par distillation, il est introduit par le tube abducteur, dans le ballon encore chaud, une quantité suffisante d'eau, puis, après avoir ouvert l'appareil, on ajoute du sulfate d'ammonium en quantité suffisante pour obtenir une solution de 10 % environ. Le mélange est alors chauffé, agité énergiquement, puis abandonné au refroidissement. La filtration a lieu à froid, sur un filtre mouillé de solution de sulfate d'ammonium. Le filtrat est distillé dans le vide, dans l'appareil habituel, jusqu'à consistance d'extrait mou et le résidu est repris par l'acétone, comme dans le cas ordinaire.

PRÉCAUTIONS A PRENDRE AU COURS DE L'EXTRACTION.

a) Il est nécessaire d'ajouter l'acétone par petites portions aux viscères pulpés, contenus dans le ballon, de façon à éviter une coagulation brutale, amenant la prise en masses compactes s'opposant à la pénétration du solvant ;

b) L'acétone possédant un point d'ébullition assez bas, il faut chauffer modérément, au cours de la digestion, et munir le ballon d'un réfrigérant efficace ;

c) L'acétone utilisé pour le lavage du résidu d'extraction et du filtre doit être mis de côté et non ajouté au premier liquide d'extraction, sans quoi il se produirait un précipité, par suite de la différence de concentration des deux liquides. On l'introduira dans le ballon distillatoire quand la majeure partie du contenu primitif aura distillé ;

d) Pour la distillation du premier liquide d'extraction, il est indispensable de prendre certaines précautions à cause de la mousse abondante et tenace qui se forme presque toujours, principalement quand on a traité des viscères putréfiés ou très riches en lipoides. Il suffit pour cela d'employer l'artifice bien connu qui consiste à introduire le liquide par petites portions, au fur et à mesure de la distillation, de façon que pendant toute l'opération il n'y ait dans le ballon qu'une petite quantité de liquide. Cette opération est facile quand on opère avec l'appareil à distillation dans le vide qui comporte une tubulure destinée à cet usage ;

e) La distillation de l'acétone, provenant de la reprise du premier extrait, se fait facilement, sans mousse, par suite sans doute de l'élimination de la plus grande partie des matières protidiques et de l'eau. On peut donc introduire d'emblée la totalité du liquide dans le ballon distillatoire. Etant donné la température d'ébullition de l'acé-

tone (56°), il est inutile de faire le vide pendant cette opération. On risquerait au contraire de perdre la plus grande partie du solvant par suite de sa grande volatilité ;

f) Dans toutes les opérations de reprise des résidus il est bon d'ajouter quelques perles de verre qui faciliteront l'extraction des substances adhérentes aux parois et diviseront les précipités au cours de l'agitation.

PURIFICATION DES SOLVANTS.

Nous avons purifié les solvants récupérés par la méthode indiquée par E. A. Werner [86].

Purification de l'éther. — A 500 cmc. d'éther, lavé à l'eau, on ajoute 4 gr. de nitrate d'argent dissous dans 30 cmc. d'eau, 50 cmc. de solution de soude à 4 % et on agite vigoureusement pendant 5 à 6 minutes. On décante l'éther, on le sèche sur le chlorure de calcium anhydre, on le filtre et on le rectifie.

Purification de l'acétone. — 700 cmc. d'acétone sont additionnés de 3 gr. de nitrate d'argent, dissous dans 20 cmc. d'eau, et de 20 cmc. de solution normale de soude. On sépare le liquide par filtration et on le sèche sur le chlorure de calcium anhydre, afin d'éliminer l'eau introduite et on distille.

DISCUSSION DE LA TECHNIQUE.

1° *Emploi de l'acétone dans la première extraction.* — Les raisons qui nous ont fait employer l'acétone dans cette opération sont, en dehors de celles que nous avons citées plus haut : 1° l'aptitude de ce solvant à coaguler les albumines dans un état de division et de consistance qui facilite leur épuisement ; 2° la filtration rapide des solutions obtenues, filtration incomparablement plus rapide qu'avec

l'alcool. D'autre part l'acétone nous a paru un solvant plus diffusible que l'alcool et assurant une meilleure pénétration des tissus compacts ;

2° Emploi simultané de l'alcool et de l'acétone. — Nous avons tenté de compléter la purification obtenue par l'acétone au moyen d'un traitement ultérieur à l'alcool absolu. Théoriquement, on pouvait penser que ce solvant amènerait la précipitation de quelques substances, telles que les céphalines et certains glycérides et pigments, qui sont solubles dans l'acétone et insolubles dans l'alcool absolu. L'expérience nous a montré qu'il était inutile de faire agir l'alcool absolu après l'acétone.

Dans tous les cas où le résidu de la première extraction à l'acétone ou à l'alcool tartrique a été repris par l'acétone pure, en quantité suffisante, ce liquide laisse à la distillation un produit entièrement soluble dans l'alcool absolu. Ce qui indique que le traitement à l'acétone est suffisant pour éliminer toutes les substances que l'on précipite habituellement par l'alcool absolu.

Si, au contraire, on traite par l'acétone, le résidu obtenu par la méthode Stas-Otto-Ogier, et purifié par l'alcool absolu, on obtient toujours un précipité constitué par des impuretés que l'alcool absolu s'était montré incapable d'éliminer ;

3° Reprise par l'eau du premier résidu d'extraction. — Les substances les plus gênantes, dans l'épuisement par les solvants de la solution aqueuse obtenue en fin de technique, sont certainement les lipides qui échappent, le plus souvent, aux purifications par l'alcool et même par l'acétone. Leur très faible solubilité dans l'eau nous a incité à recourir dans certains cas à une opération, figurant déjà dans la technique primitive de Stas, et qui est encore usitée par beaucoup de toxicologues. Pour les organes riches en

lipides, tels que le cerveau et le foie, nous avons trouvé avantage à procéder à une reprise par l'eau du résidu laissé par la distillation dans le vide de l'acétone ayant servi à l'extraction. De cette manière, pour ces organes, il est effectué deux reprises par l'eau, suivies de filtration à froid, qui éliminent la presque totalité des lipides qui souillent l'extrait de « l'éther acide » ;

4^o *Emploi du sulfate d'ammonium.* — Nous avons adopté l'addition de sulfate d'ammonium, suivie d'un chauffage de quelques minutes, pour les deux solutions aqueuses que comporte le procédé d'extraction (pour les organes peu chargés en lipides la première reprise par l'eau n'est pas utile). En effet, l'addition de ce sel facilite la floculation des substances colloïdales qui, sans cela, restent en solution et entravent considérablement les filtrations. Ce sel se retrouve dans l'extrait sirupeux de la concentration de la solution aqueuse provenant de la première reprise par l'eau ; comme il est insoluble dans l'acétone, il précipite lors de l'addition de ce solvant, assurant une parfaite division du résidu à extraire. Nous indiquons d'ajouter directement le sel cristallisé dans le ballon, car si on l'introduisait, sous forme de solution, par le tube abducteur, celui-ci pourrait être obstrué à cause de la cristallisation du sel au contact de l'acétone.

Nous ne croyons pas que l'emploi du sulfate d'ammonium présente d'inconvénients, d'autres sels neutres (chlorure de sodium, etc.) ayant déjà été proposés en toxicologie pour augmenter la densité des solutions aqueuses et éviter des émulsions ;

5^o *Filtration des solutions aqueuses.* — Ogier et Kohn-Abrest dans leur traité (t. II, p. 99) disent : « La solution aqueuse et acide qui contient les alcaloïdes et les glucosides est généralement trouble ; comme il peut y exister

« des alcaloïdes insolubles dans l'eau, il ne faut pas filtrer « cette solution ». Nous avons observé que cette solution n'est pas simplement trouble, mais que dans la plupart des cas elle renferme un précipité parfois abondant. Cela n'est pas surprenant, car la solution alcoolique précédente contient une grande quantité de lipides (cholestérols, lécithines, etc.), qui sont solubles dans l'alcool, et précipitent par addition d'eau. Avec les solutions acétoniques des faits analogues se produisent.

L'agitation des liqueurs, contenant de tels précipités, avec des solvants, risque de produire des émulsions. Les produits en suspension peuvent échapper à l'extraction par l'éther de pétrole et venir souiller les extraits éthérés, notamment celui de l'éther acide. Plusieurs auteurs : Autenrieth [1], Sabalitschka [63], indiquent de filtrer la solution aqueuse, avant l'épuisement par les solvants volatils. C'était d'ailleurs ce qu'indiquait déjà Dragendorff. Mameli [47] recommande également de filtrer cette solution et de réserver, pour un examen ultérieur, ce qui reste sur le filtre. Tenant compte de l'opinion de ces divers auteurs, et du fait qu'en employant une quantité d'eau suffisante, on ne risque guère d'éliminer des produits intéressants, nous avons toujours filtré nos solutions aqueuses après refroidissement, et sur des filtres mouillés. De cette manière nous avons réussi à nous débarrasser de la plupart des lipides gênants. C'est pourquoi nous avons pu éviter l'extraction par le pétrole léger, dont on verra ci-dessous les inconvénients dans le cas qui nous intéresse.

6° *Epuisement par l'éther de pétrole.* — L'emploi de ce solvant, qui figurait déjà dans la technique de Dragendorff, a été repris par Kohn-Abrest qui fait subir à la solution aqueuse acide un épuisement par l'éther de pétrole pour compléter sa purification. Cette opération a, dans

la technique de Stas-Otto, d'incontestables avantages ; mais nous l'avons supprimée dans la méthode que nous proposons, pour les raisons suivantes : ayant en vue l'extraction de petites quantités de barbituriques, nous avons craint que ces produits, malgré leur faible solubilité dans l'éther de pétrole, soient entraînés par ce solvant surtout quand il se trouve chargé en lipides.

Nous avons pu constater, d'autre part, que trois épaissements à l'éther de pétrole (ainsi que le conseille Kohn-Abrest) n'enlèvent pas la totalité du cholestérol ajouté, sous forme de suspension laiteuse, à une solution aqueuse d'acide tartrique. Le traitement ultérieur de cette solution par l'éther permet de retrouver, dans le résidu d'évaporation de l'éther, plus de 10 % du cholestérol mis en œuvre (5 mgr. pour 50 mgr.). Ceci indique que la solubilité du cholestérol dans l'éther de pétrole n'est pas suffisante, en présence d'eau, pour assurer son extraction totale.

7^o Purification de la solution aqueuse par épuisement à l'éther en milieu alcalin. — Quelques auteurs, généralement en vue de recherches concernant uniquement les barbituriques, pratiquent, à titre de purification, un épuisement par l'éther de la solution aqueuse préalablement alcalinisée. Il est bien entendu qu'une telle façon de procéder s'éloigne de la méthode générale d'extraction des poisons organiques et n'est pas applicable en présence d'alcaloïdes.

Les dérivés barbituriques étant, en milieu alcalin, solubles dans l'eau et insolubles dans l'éther, il en résulte une séparation de ces produits d'avec un certain nombre d'impuretés. Mais il faut noter que l'alcalinité du milieu doit être suffisante, certains auteurs, Weiss [85] en particulier, ayant pu extraire les barbituriques de solutions alcalinisées par le carbonate de soude, en présence de

rouge de méthyle. Un certain nombre d'impuretés, telles que les acides gras, qui accompagnent les barbituriques dans divers extraits viscéraux, ne sont pas éliminés par cette méthode. Enfin, nous avons vu que tout traitement des barbituriques en solution aqueuse alcaline risque d'en provoquer l'altération partielle. Toutefois, moyennant certaines précautions, cette méthode de purification peut être employée dans la recherche des barbituriques, pour les organes riches en lipides, et elle donne alors des résultats meilleurs que l'extraction à l'éther de pétrole en milieu acide.

8° *Dessiccation de la solution éthérée.* — Cette opération, généralement nécessaire pour priver totalement l'éther des sels minéraux entraînés, peut être pratiquée, comme nous l'indiquons, au moyen de sulfate de soude anhydre. Il faut alors avoir soin de prolonger suffisamment le contact avec l'agent déshydratant en excès. Sans quoi on observe parfois une cristallisation, dans le résidu, de sulfate de soude dissous par l'éther aqueux.

Certains auteurs ont proposé l'emploi de la gomme adragante pulvérisée pour remplir cet effet. La gomme a une action rapide et facile à constater. Mais pour en éliminer l'excès il est nécessaire de filtrer sur papier. Le sulfate de soude au contraire s'élimine facilement par simple passage sur un tampon bien serré de coton hydrophile.

Enfin, quand le résidu d'évaporation de l'éther doit être soumis immédiatement à la purification pour la recherche des barbituriques, qui comporte des opérations en milieux aqueux, la déshydratation de l'éther ne présente pas d'intérêt ;

9° *Rétention des barbituriques par les lipides.* — Nous avons pu observer, au cours de nos essais, que le rende-

ment obtenu en barbituriques, tant par la méthode d'Ogier-Kohn-Abrest que par la méthode à l'acétone, était, en général, légèrement plus élevé quand on opérait sur de petites quantités que pour des doses notables, dépassant d'ailleurs les conditions toxicologiques. Nous supposons que la rétention par les lipides joue un rôle dans la production de ces anomalies. Lagarce [43] a déjà signalé que les lipides du foie retiennent une quantité importante de barbituriques (27 % pour le dial) et qu'il est très difficile de les extraire en totalité. Nous-même avons montré plus haut que, dans la méthode de Stas-Otto-Ogier, une certaine quantité de dérivés barbituriques se retrouvait dans les lipides éliminées au cours des manipulations.

Une explication possible du bon rendement obtenu pour les quantités minimales est donnée par les propriétés des barbituriques. Ces corps possèdent en effet une solubilité dans l'eau très minime, surtout à froid, et leur vitesse de dissolution est faible. D'autre part, ils sont notablement solubles dans les lipides et possèdent un

coefficient de partage $\frac{\text{lipides}}{\text{eau}}$ fortement accru en présence

d'acides gras libres. (Velluz [82]). Le partage semble se faire dans des conditions particulièrement défavorables pour la phase eau quand on approche de la saturation. Comme, dans la plupart des expériences, on met toujours en œuvre des quantités sensiblement égales d'eau et de solvants, quelles que soient les quantités de barbituriques à extraire, il est possible que, pour les grosses doses de ces toxiques, le coefficient de partage joue dans son sens défavorable. Nous avons pensé qu'il y avait intérêt dans tous les cas, contrairement à ce qui est indiqué par beaucoup d'auteurs, à employer pour la reprise par l'eau un volume relativement grand. Dans une expérience où nous avons ajouté 50 mgr. de gardénal à 100 gr. de foie de bœuf et pratiqué l'extraction par la méthode à l'acétone,

nous avons obtenu un rendement de 62 %. Dans cette expérience la solution aqueuse avait un volume de 100 cmc. (la solubilité du gardénal dans l'eau est de 9 cgr. pour 100 cmc.). Nous avons alors pratiqué une reprise par l'eau à chaud des lipides éliminés au cours des manipulations. Pour cela nous les avons dissous dans l'éther, mis la solution étherée au contact de 200 cmc. d'eau, qui a été chauffée au bain-marie pour chasser l'éther. Au liquide chaud nous avons ajouté 5 gr. de paraffine fondue. Par refroidissement il s'est séparé un gâteau compact et la liqueur aqueuse, filtrée, a été épuisée par l'éther. Dans ces conditions l'eau chaude dissout le gardénal et les lipoïdes se trouvent englobés dans la paraffine, qui possède un coefficient de partage nul, comme l'a montré Velluz [82], et dont la solidification permet une séparation facile et totale. La solution aqueuse filtrée a été extraite par l'éther et le résidu de distillation de celui-ci soumis à la microsublimation. Dans le sublimat, d'un poids de quelques dixièmes de mgr. nous avons pu caractériser le gardénal par la microréaction de Denigès. Cette expérience montre que la rétention des barbituriques par les lipoïdes est manifeste et qu'il est très difficile de les en séparer. Le procédé que nous avons employé dans ce cas pourrait d'ailleurs être utilisé, dans certaines expériences, pour la récupération d'une partie au moins des barbituriques qui échappent au procédé ordinaire d'extraction.

10^o *Généralisation de l'emploi de l'acétone.* — Le temps nous a manqué pour vérifier si l'emploi de l'acétone était applicable, d'une façon générale, à la recherche de tous les poisons organiques fixes. Nous n'avons pas effectué de recherches systématiques sur la solubilité des glucosides et des sels d'alcaloïdes dans ce solvant. Les quelques essais que nous avons tentés nous permettent de penser, qu'aux doses toxicologiques, la solubilité dans

l'acétone des principaux alcaloïdes est suffisante pour permettre leur extraction ; d'ailleurs, comme on le verra par la suite, nous avons pu retrouver par notre méthode la strychnine, soit ajoutée à des viscères, soit contenue dans les organes prélevés après intoxication par le véronal et cet alcaloïde.

Nous avons appliqué la méthode, ainsi décrite, à de nombreuses extractions de dérivés barbituriques. Le produit fourni par la distillation de « l'éther acide » a été ensuite soumis à la purification par le noir « norit » de Poulenc et microsublimation suivant la technique que nous avons choisie.

CHAPITRE V

Résultats fournis par la technique proposée.

a) In vitro sur des viscères additionnés de toxiques.

1^o AVEC LE VÉRONAL.

A. — Expériences ayant porté sur des viscères frais.

Première expérience :

Foie de bœuf : 100 gr.
Véronal : 50 mgr.
Véronal trouvé : 41 mgr.
Rendement : 82 %.

Deuxième expérience :

Foie de bœuf : 100 gr.
Solution de véronal à 0,50 % : 4 cmc. : 20 mgr.
Véronal trouvé : 13 mgr. 8.
Rendement : 69 %.

Troisième expérience :

Sang humain : 100 gr.
Véronal en solution : 50 mgr.
Véronal trouvé : 43 mgr.
Rendement : 86 %.

B. — Expériences ayant porté sur des viscères putréfiés.

Première expérience :

Foie de bœuf putréfié : 100 gr.
 Véronal : 50 mgr.
 Véronal trouvé : 38, mgr. 5.
 Rendement : 77 %.

Deuxième expérience :

Sang humain putréfié : 100 gr.
 Véronal : 50 mgr.
 Véronal trouvé : 41, mgr. 5.
 Rendement : 83 %.

Troisième expérience :

Sang humain putréfié : 100 gr.
 Véronal : 50 mgr.
 Véronal trouvé : 39 mgr.
 Rendement : 78 %.

Quatrième expérience :

Cervelle de mouton putréfiée : 100 gr.
 Véronal : 50 mgr.
 Véronal trouvé : 42 mgr.
 Rendement : 84 %.

RÉSUMÉ

Viscères frais		Viscères putréfiés	
Organe ou tissu	Rendement %	Organe ou tissu	Rendement %
Foie.....	82	Foie.....	77
Foie.....	69	Sang.....	83
Sang.....	86	Sang.....	78
		Cerveau.....	84

Ces expériences ont été effectuées avec de fortes doses de véronal, bien supérieures à celles rencontrées dans les recherches toxicologiques, dans le but d'étudier le rendement de la méthode.

Le tableau suivant permet la comparaison des résultats, par la méthode à l'acétone et par la méthode classique, dans des expériences portant sur des doses similaires de barbituriques et sur des organes frais et putréfiés.

Viscères frais			Viscères putréfiés		
Organe	Rendement %		Organe	Rendement %	
	Méthode classique	Méthode à l'acétone		Méthode classique	Méthode à l'acétone
Foie	74	82	Foie	74	77
Sang	80	86	Sang	76	83
			Cerveau . . .	54	84

2° AVEC LE GARDÉNAL.

A. — Expériences ayant porté sur des viscères frais.

Première expérience :

Foie de bœuf : 100 gr.
 Gardénal : 50 mgr.
 Gardénal trouvé : 31 mgr.
 Rendement : 62 %.

Deuxième expérience :

Sang : 100 gr.
 Gardénal : 20 mgr.
 Gardénal trouvé : 15, mgr. 8.
 Rendement : 79 %.

B. — Expériences effectuées avec de petites quantités de véronal.

Le véronal était introduit sous forme de solution aqueuse, à 0 gr. 10 %, et laissé en contact plusieurs heures avec les viscères, à la température du laboratoire, en agitant fréquemment.

Première expérience :

Sang : 100 gr.
Véronal : 5 mgr.
Véronal trouvé : 4 mgr. 4.
Rendement : 88 %.

Deuxième expérience :

Sang : 100 gr.
Véronal : 1 mgr.
Véronal trouvé : 0, mgr. 85.
Rendement : 85 %.

Troisième expérience :

Foie de bœuf : 100 gr.
Véronal : 1 mgr.
Véronal trouvé : 0, mgr. 87.
Rendement : 87 %.

Quatrième expérience :

Foie de bœuf putréfié : 100 gr.
Véronal : 1 mgr.
Véronal trouvé : 0,79 mgr.
Rendement : 79 %.

Cinquième expérience :

Cervelle de mouton : 50 gr.
Véronal : 1 mgr.
Véronal trouvé : 0 mgr. 91.
Rendement : 91 %.

Sixième expérience :

Cervelle de mouton : 100 gr.
Véronal : 0 mgr. 5.
Véronal trouvé : traces de dérivé barbiturique.

Septième expérience :

Rognons de bœuf : 100 gr.
Véronal : 1 mgr.
Véronal trouvé : 0 mgr. 8.
Rendement : 80 %.

b) Application de la méthode à l'acétone à la recherche des barbituriques chez des intoxiqués.

Nous avons pu effectuer un certain nombre de recherches de ce genre chez des malades ayant absorbé, dans un but de suicide, des barbituriques et hospitalisés à l'Hôpital Boucicaut ou à l'Hôpital Necker.

CAS N° 1.

Intoxication suivie de mort. Malade N... Service du Dr Trémolières, Hôpital Boucicaut.

Ce malade, amené à l'hôpital dans le coma, a subi une saignée abondante. Nous avons pratiqué l'extraction des barbituriques, par la méthode à l'acétone, sur 210 gr. de sang. Nous avons obtenu un résidu bien cristallisé, jaunâtre, qui est soumis à la purification par le charbon. Finalement il est extrait :

19 mgr. 5 de véronal

qui a été identifié par son point de fusion au bloc de Maquenne, $F = 191^{\circ}$, et la réaction microchimique de Denigès. La concentration d'hypnotique dans le sang était donc de :

92 mgr. par litre.

Il ne nous a pas été possible de connaître la quantité de véronal ingérée ; le malade est mort le jour même de son admission, sans sortir du coma.

CAS N° 2.

Intoxication aiguë qui évolue vers la guérison. Malade S... Service du Dr Trémolières, Hôpital Boucicaut, novembre 1933. Le malade est plongé dans un sommeil

profond avec abolition des réflexes. On pratique une saignée abondante et nous effectuons la recherche sur 225 gr. de sang, par la méthode à l'acétone. Le premier extrait obtenu contient des cristaux très bien formés et presque incolores. Après purification l'extrait pèse 23 mgr. 5 et est identifié, comme précédemment, par le point de fusion (185°) qui permet de conclure que le toxique utilisé était du véronal.

La concentration de l'hypnotique dans le sang était de :

104 mgr. par litre.

Pour ce malade nous avons pratiqué également la recherche du véronal dans les urines. Nous en avons profité pour effectuer la comparaison entre la méthode proposée récemment par Paget et Desodt [53] et la défécation au plomb. L'urine recueillie, d'un volume de 650 cmc. a été divisée en deux portions égales. Sur l'une d'elles nous avons pratiqué l'extraction, après défécation au plomb, selon la technique employée par M. Fabre [48] et que nous rappelons ci-dessous :

« La totalité de l'urine émise en 24 heures est déféquée
« au moyen du 1/10 de son volume de sous-acétate de
« plomb, le mélange est filtré et le volume du filtrat, exactement noté, correspond à une partie aliquote de l'urine
« totale. Après élimination du plomb, par une solution
« saturée de sulfate de soude, le liquide est acidifié par
« addition d'acide chlorhydrique dilué. Le dérivé barbiturique est extrait à l'éther par trois épuisements successifs.
« Les solutions éthérées, desséchées sur du sulfate de
« soude anhydre, sont distillées à sec, le résidu est repris
« par l'eau distillée en présence du noir animal. Après
« 30 minutes de digestion au bain-marie la solution aqueuse
« est filtrée, le filtre convenablement lavé. La liqueur est
« alors évaporée à sec, dans un vase taré, et le résidu cristallin est constitué par le composé cherché. Il est iden-

« tifié par la détermination du point de fusion et la préparation de son dérivé xanthylé ».

Sur l'autre portion d'urine l'extraction est réalisée, selon les indications de Paget et Desodt, qui utilisent la technique suivante :

« Prendre un volume V d'urine (250 à 500 cmc.) ou plus si la concentration barbiturique est supposée faible. Y ajouter V/10 cmc. de solution de ferrocyanure de potassium à 15 %. Agiter énergiquement. Ajouter ensuite V/10 cmc. solution d'acétate de zinc à 112 gr. %.

« Mélanger vivement à l'aide d'un gros agitateur, et filtrer sur filtre grossièrement plissé, reposant sur une couche de coton non tassé, placée dans la douille d'un grand entonnoir. Mesurer exactement le filtrat. Vérifier son acidité et au besoin l'obtenir par quelques gouttes d'acide acétique.

« Dans une grande ampoule à décantation mettre la totalité du filtrat. Ajouter, sans mélanger, 75 cmc. d'éther sulfurique. Mélanger avec précaution d'abord, puis plus vivement, au bout de quelques minutes soutirer lentement la portion aqueuse (urine) dans l'éprouvette ayant servi à la défécation et qui aura été rincée au préalable. Décanter avec beaucoup de soin, en la versant par l'ouverture supérieure de l'ampoule, la solution éthérée dans un ballon qui sera ensuite bouché.

« Refaire successivement quatre épuisements éthérés du filtrat urinaire en suivant rigoureusement les indications précédentes. Employer chaque fois 75 cmc. d'éther et recueillir toutes les solutions éthérées dans le ballon précédent.

« Dessécher les solutions éthérées sur du sulfate de soude anhydre. Prolonger le contact 20 minutes, après quelques agitations souvent répétées. Filtrer l'éther sur coton dans un grand Erlenmeyer. Exprimer le coton. Distiller l'éther au bain-marie.

« Le résidu obtenu est traité par l'alcool bouillant (10 à 20 cmc. d'alcool suivant l'importance du dépôt). Maintenir l'Erlenmeyer au bain-marie pendant quelques minutes. Filtrer la solution alcoolique et recueillir le filtrat dans une capsule tarée. Evaporer la solution au bain-marie ».

Voici les résultats que nous avons obtenu :

Technique de Fabre.

325 cmc. d'urine donnent 214 mgr. de véronal.
Concentration : 0 gr. 65 par litre d'urine.

Technique de Paget et Desodt :

325 cmc. d'urine donnent 198 mgr. de véronal.
Concentration : 0 gr. 60 par litre d'urine.

Comme on peut le voir, les deux techniques donnent des résultats voisins. Il nous a paru qu'avec la méthode de Paget et Desodt, la défécation était moins parfaite et que le liquide possédait une légère tendance à former des émulsions.

Dans ce cas également nous n'avons pas pu connaître, avec précision, la dose de véronal absorbée par le malade.

CAS N° 3.

Intoxication aiguë suivie de mort. Malade V... Service du Dr Trémolières, Hôpital Boucicaut, janvier 1934.

La malade est amenée à l'hôpital dans le coma et meurt le cinquième jour, sans reprendre connaissance. Environ soixante heures après l'absorption du toxique on pratique une saignée et nous recevons, au laboratoire, 290 gr. de sang.

Sur 50 gr. de ce sang nous avons effectué la recherche des barbituriques par la méthode rapide que nous décri-

vons plus loin et qui nous a permis d'identifier le toxique comme étant du gardénal, par la réaction microchimique de Denigès.

Les 240 gr. de sang restants ont été partagés en deux parties égales. Sur la première partie nous avons pratiqué l'extraction des barbituriques par la méthode à l'acétone et sur l'autre partie nous avons appliqué le procédé classique d'Ogier-Kohn-Abrest de façon à pouvoir établir une comparaison entre les résultats fournis, dans des conditions identiques, par ces deux méthodes.

Dans le procédé à l'acétone, après purification au noir, et extraction ultérieure à l'éther de la solution aqueuse décolorée, nous avons obtenu un résidu très bien cristallisé. (La cristallisation a été améliorée par dissolution du résidu dans un peu d'eau à chaud et évaporation de la solution dans le vide sulfurique). Le poids de ce résidu était de 35 mgr. ce qui correspond à une concentration du gardénal dans le sang de :

29 mgr. par litre.

Sur ce résidu nous avons pratiqué ensuite la microsublimation; cette opération s'est effectuée très facilement, en laissant un résidu infime, et en donnant un produit bien cristallisé. Nous n'avons pas pesé le sublimat, désirant conserver le tube à titre de démonstration de la méthode.

La méthode de Stas, après purification du résidu, dans les mêmes conditions que précédemment, nous a fourni un produit huileux jaunâtre de quelques mgr. qui est soumis à la microsublimation. Cette opération laisse un résidu très notable et le produit sublimé est huileux, constitué par des gouttelettes, ne présentant aucune cristallisation.

Ces expériences montrent que le résidu obtenu par la méthode à l'acétone est incontestablement plus pur et plus

abondant que celui fourni par l'extraction à l'alcool. Il est probable que le mauvais rendement observé dans cette dernière méthode est dû aux pertes causées par les émulsions et peut-être à l'entraînement du gardénal par l'éther de pétrole.

Dans les trois cas que nous venons de citer, nous avons, comme l'a indiqué Lagarce, divisé le caillot sanguin par broyage au mortier avec du sable. De cette manière, les hématies, qui, comme l'ont montré MM. Fabre et Frenet [18], fixent la plus grande partie du toxique, peuvent être épuisées par les solvants, alcool ou acétone.

CAS N° 4.

Intoxication suivie de mort. Malade X... Service du Dr Laederich, Hôpital Necker. A l'autopsie il a été prélevé la glande thyroïde du poids de 31 gr. environ et dans laquelle nous avons effectué l'extraction des barbituriques. Il nous a été possible de caractériser par microsublimation 0, mgr. 9 d'un barbiturique identifié avec le gardénal.

c) Application de la méthode

à l'acétone à des expériences de toxicologie animale.

Etude de la localisation du véronal chez le chien dans l'intoxication aiguë.

A une chienne, pesant 11 kgr. 600, nous avons administré successivement : du véronal par voie digestive et de la strychnine par voie sous-cutanée ; ce qui nous a permis d'étudier la répartition de ces deux toxiques, ainsi que leur action antagoniste.

L'animal reçoit le véronal en solution aqueuse, au moyen d'une sonde œsophagienne, et la strychnine, sous

forme de sulfate, en solution à 1 %, par injection sous-cutanée. Il lui est ainsi administré :

à 10 h. 45.....	1 gr. de véronal,
à 11 h. 45.....	1 gr. 50 de véronal,
à 12 h.....	1 cgr. de sulfate de strychnine,
à 14 h. 30.....	3 cgr. de sulfate de strychnine,
à 16 h. 30.....	1 gr. de véronal,
à 17 h.....	2 cgr. de sulfate de strychnine,
à 17 h. 30.....	4 cgr. de sulfate de strychnine.

Au total l'animal a donc reçu 3 gr. 50 de véronal et 10 cgr. de sulfate de strychnine, correspondant à 39 mgr. de strychnine base.

Après l'ingestion des premières doses de véronal, c'est-à-dire vers 12 h., l'animal présente des signes de somnolence très profonde. C'est alors qu'on lui injecte la première dose de strychnine, qui est suivie, deux heures et demie après, d'une autre dose de 3 cgr. Peu de temps après, l'animal commence à manifester des symptômes d'intoxication par la strychnine. Il tombe sur le côté et présente des convulsions caractéristiques. A 16 h. 30 on lui administre à nouveau 1 gr. de véronal, ce qui paraît le calmer légèrement. Enfin, dans le but de terminer l'expérience, on lui injecte à 17 h., 2 cgr. de sulfate de strychnine qui provoquent des convulsions intenses sans toutefois amener la mort. Celle-ci ne survient que quelques minutes après une dernière injection de 4 cgr. de sulfate de strychnine, pratiquée à 17 h. 40. L'autopsie de l'animal est effectuée aussitôt et les organes recueillis et pesés.

Nous avons pu remarquer, au cours de cette expérience, combien un animal intoxiqué par le véronal se montrait résistant vis-à-vis de l'intoxication par la strychnine. Si l'on admet que la dose mortelle pour le chien est d'environ 1 mgr. par kgr., nous voyons que le chien qui, à 14 h. 30, avait déjà reçu 40 mgr. de sulfate de strychnine,

aurait dû succomber rapidement. Au contraire, il a fallu lui administrer à nouveau 20 mgr. puis 40 mgr. de toxique pour amener sa mort. Il est probable que l'action inverse, de protection contre l'intoxication barbiturique, exercée par la strychnine aurait pu être mise en évidence si les circonstances nous avaient permis de prolonger l'expérience.

Toutefois, les résultats observés confirment l'idée, aujourd'hui admise, que la strychnine peut être administrée avec profit aux intoxiqués par des barbituriques et que, peut-être, réciproquement, les intoxiqués à la strychnine bénéficieraient d'un traitement par les barbituriques.

Sur les organes principaux de la chienne, ainsi intoxiquée, nous avons pratiqué l'extraction du véronal et sa purification, suivant la méthode personnelle décrite précédemment. Voici les chiffres trouvés :

Désignation de l'organe	Poids de l'organe prélevé	Quantité de véronal trouvé (en mgr.)
Cerveau.....	75 gr.	19,6
Cœur et sang.....	250 gr.	94,4
Poumons.....	115 gr.	22,5
Tube digestif.....	520 gr.	468,4
Foie.....	390 gr.	115
Pancréas.....	30 gr.	5
Rate.....	50 gr.	2,6
Reins.....	72 gr.	26,5

Le poids total des viscères analysés atteint 1.502 gr. et la quantité de véronal extraite 754 mgr. Ce produit a été purifié par recristallisation dans l'alcool et on en a vérifié le point de fusion, qui était de 187°, au bloc de Maquenne.

Le pourcentage de véronal, en mgr. pour 100 gr. d'organes s'établit, dans notre expérience, de la manière suivante :

Organe	Quantité de véronal en mgr. pour 100 gr.
Tube digestif.....	90
Cœur et sang.....	37,7
Reins.....	36,8
Foie.....	29,4
Cerveau.....	26,1
Poumons.....	19,5
Pancréas.....	16,6
Rate.....	5,2

Ces résultats sont à comparer avec ceux obtenus par MM. Fabre et Fredet [18] dans leur étude si complète de la localisation des barbituriques chez le chien :

Organe	Quantité de véronal en mgr. pour 100 gr.
Cerveau et moelle.....	138
Sang total.....	10,2
	} 6,6 hématies
	} 3,6 sérum
Rate.....	44
Graisse.....	14
Muscles striés.....	13
Reins.....	5
Foie.....	4

On peut noter, entre les résultats de MM. Fabre et Fredet et les nôtres, des différences notables, qui s'expliquent par le fait que les conditions expérimentales ne sont pas semblables. La voie d'administration a été différente, MM. Fabre et Fredet ont opéré par voie intraveineuse, alors que nous avons administré le toxique par la voie digestive. La dose utilisée est également différente, ainsi que la nature des organes prélevés. Enfin, l'intoxication par la strychnine qu'a subi l'animal de notre expérience, a pu jouer un rôle dans la répartition du toxique.

Les résultats que nous avons obtenus nous conduisent aux commentaires suivants :

a) L'absorption du toxique ne paraît pas avoir été complète, puisque nous avons pu extraire une grande quantité de véronal du tube digestif ;

b) Le foie a présenté une teneur assez élevée en barbituriques, bien supérieure à celle indiquée par MM. Fabre et Fredet, ce qui s'explique facilement par la voie d'introduction du toxique, le foie étant obligatoirement traversé par le toxique absorbé par voie digestive. La concentration du véronal dans le foie n'a d'ailleurs pas été, dans notre expérience, beaucoup supérieure à celle d'autres organes comme les poumons ou le cerveau ;

c) Nous avons observé, en accord avec MM. Fabre et Fredet, que la teneur du sang en barbituriques est relativement très élevée ;

d) Pour les autres organes, la rate mise à part, parce que le résultat trouvé nous paraît difficilement explicable, la teneur en toxiques est sensiblement proportionnelle au poids ;

NOTE — Nous n'avons pu recueillir les urines émises par l'animal pendant les périodes de convulsions, causées par la strychnine et, à l'autopsie, la vessie était vide.

Les résultats fournis par la recherche de la strychnine dans les organes de cet animal, au moyen de la méthode à l'acétone, sont mentionnés dans le chapitre VII de ce travail.

Localisation des barbituriques dans les glandes endocrines.

M. Fabre [15] a établi que le chloroforme se fixe en très forte proportion dans la cortico-surrénale. Dans des recherches qu'il poursuit actuellement, sur la localisation de nombreux toxiques organiques et minéraux dans les glandes endocrines, il a été amené à étudier la teneur de

ces glandes en dérivés barbituriques, chez des animaux intoxiqués par ces produits. Ces recherches ont un grand intérêt, tant au point de vue toxicologique qu'au point de vue biologique, en raison du rôle de ces glandes, de leur riche vascularisation et des troubles importants produits dans l'organisme par leurs altérations. Sur ses conseils nous avons appliqué la méthode à l'acétone, suivie de la microsublimation, à la recherche du véronal dans les thyroïdes et les surrénales de l'animal que nous avons intoxiqué et qui nous a servi pour nos études de localisation. Dans les surrénales pesant 1 gr. 30 et dans les surrénales pesant 1 gr. 85 nous avons pratiqué l'extraction à l'acétone, en simplifiant la technique en raison du faible poids de l'organe mis en œuvre. C'est ainsi que la purification n'a compris qu'une microsublimation qui a fourni directement des cristaux très nets, caractérisés par comparaison à la loupe avec un sublimat de véronal pur, obtenu dans les mêmes conditions. Par comparaison également avec des sublimats de véronal correspondant à des poids connus nous pouvons évaluer approximativement le poids de véronal extrait de ces glandes à 15 centièmes de mgr. pour chacune d'elles. Nous rappelons également que dans le cas n° 4, nous avons extrait de la thyroïde, pesant 31 gr., 0 mgr. 9 de gardénal.

CHAPITRE VI

a) Méthode rapide pour la recherche des dérivés barbituriques dans le sang.

Le traitement des intoxications barbituriques comporte, selon des indications de Tardieu, [76] des saignées abondantes destinées à faciliter l'élimination du toxique. Il arrive souvent que la recherche des barbituriques est demandée, sur le sang ainsi prélevé, dans le but de confirmer le diagnostic et d'identifier le toxique ingéré. Pour répondre à ces conditions particulières de recherche, nous avons imaginé une technique simplifiée, qui permet de mettre en évidence les barbituriques dans le sang aux doses de 1 mgr. par 10 cmc. et cela en trois heures environ. Le principe de la méthode consiste à épuiser le sang par une quantité suffisante d'acétone, en présence d'acide tartrique. L'acétone est distillée au bain-marie, et le résidu est repris par une solution de sulfate d'ammonium à 15 %, dont l'épuisement à l'éther fournira le dérivé barbiturique, dans un état de pureté suffisant pour l'identification.

TECHNIQUE.

Opérer sur 50 cmc. de sang, au minimum. S'il est coagulé, ce qui est le cas le plus fréquent, introduire le sérum dans un ballon et placer le caillot dans un mortier où on le triture avec du sable en présence de 1 gr. d'acide tartrique.

Verser dans le mortier, par petites portions et en agitant, de l'acétone à raison de 100 cmc. pour 50 cmc. de sang. Décanner l'acétone et le verser dans le ballon contenant le sérum. Cette addition de l'acétone au sérum doit se faire lentement et en agitant, de façon à obtenir une précipitation des albumines en flocons très divisés. En s'aidant d'une spatule et de 100 cmc. d'acétone, on transvase le contenu du mortier dans le ballon. Si, par hasard, le sang avait été additionné d'un anticoagulant, il suffirait de le verser directement dans le ballon et de l'additionner d'acétone, avec les précautions indiquées ci-dessus, pour obtenir une bonne division du précité albuminoïdique.

On adapte au ballon un réfrigérant à reflux et on chauffe au bain-marie, de façon à maintenir le liquide en ébullition pendant 20 minutes environ. On refroidit dans l'eau froide, ou mieux avec de la glace, le ballon et son contenu et on filtre sur un filtre mouillé avec de l'acétone, en recevant le filtrat dans une capsule. Au résidu restant dans le ballon, on ajoute 50 cmc. d'acétone et on chauffe au bain-marie à nouveau pendant 10 minutes. Après refroidissement, comme précédemment, on filtre. Le ballon et le filtre sont lavés avec une petite quantité d'acétone et les liquides acétoniques sont distillés ou simplement évaporés au bain-marie dans une capsule. Le résidu est repris par 100 cmc. d'eau distillée contenant environ 15 gr. de sulfate d'ammonium. La solution est chauffée quelques minutes au bain-marie, pour chasser complètement l'acétone, en même temps que l'on agite pour faciliter la dissolution des produits contenus dans le précipité déposé sur les parois. On refroidit alors soigneusement et l'on filtre, sur un filtre mouillé, en recevant directement le filtrat dans une ampoule à décantation. Le liquide, dont on vérifie la réaction acide, est épuisé à trois reprises avec 100, 50 et 50 cmc. d'éther. Les liqueurs éthérées, réunies, sont lavées dans l'ampoule à décantation

avec 10 cmc. d'eau. L'éther est évaporé par petites portions dans une fiole conique, puis, quand il n'en reste plus que quelques centimètres cubes, transvasé dans un cristallisoir où on achève l'évaporation au bain-marie.

Quand le sang renferme des quantités de barbituriques supérieures à 5 mgr. pour 50 cmc., le résidu présente l'aspect cristallin caractéristique. Il est possible alors d'identifier le produit en utilisant les réactions spécifiques telles que celle de Denigès. Quand le résidu est amorphe, ou ne fournit pas les réactions caractéristiques, il est alors nécessaire d'en effectuer la purification suivant la technique que nous avons indiquée. Mais, dans la plupart des cas, chez les intoxiqués graves, la teneur du sang en hypnotiques est suffisante pour que l'identification soit possible sur le premier extrait.

Nous avons pratiqué l'expérience suivante pour vérification de la méthode, au point de vue du rendement. A 50 gr. de sang humain il a été ajouté 5 mgr. de véronal. L'extraction, conduite comme ci-dessus, a nécessité 300 cmc. d'acétone et 200 cmc. d'éther et a demandé trois heures. Le résidu obtenu, bien cristallisé et incolore, pesait 4 mgr., 1 ce qui correspond à un rendement de 82 %.

Sur le sang d'une malade intoxiquée par le gardénal (cas n° 3, malade Mlle V...) qui nous a servi par ailleurs à des expériences comparatives entre la méthode Ogier-Kohn-Abrest et la méthode à l'acétone, nous avons pratiqué l'extraction du toxique par cette méthode rapide. Le produit isolé n'étant pas suffisamment caractéristique, nous l'avons soumis à la purification complète et nous avons pu, par microsublimation, obtenir des cristaux donnant nettement la réaction microchimique de Denigès pour le gardénal. Or, d'après les recherches faites par ailleurs, la teneur de ce sang en gardénal était de 29 mgr. pour 1000, soit 1 mgr. 4 pour les 50 cmc. mis en œuvre par la méthode rapide.

On remarquera que, dans cette méthode rapide, nous n'avons pas formellement indiqué la récupération des solvants. C'est que cette opération présente quelques difficultés, en particulier pour l'acétone dont la distillation demande des précautions, à cause de la mousse qui peut se former. Mais, si l'on dispose de suffisamment de temps, cette récupération peut être pratiquée sans inconvénient. Nous préférons ce procédé rapide d'extraction à l'acétone à la technique indiquée par Desodt [9], qui applique au sang la méthode qu'il a décrite, en collaboration avec Paget, pour la recherche des barbituriques dans les urines.

La méthode de Desodt n'est applicable que sur du sang rendu incoagulable, ce qui est rarement le cas pour les prélèvements envoyés au laboratoire.

La technique est la suivante : « prendre un volume V « de sang total — 50 cmc. par exemple —, les verser dans « un ballon jaugé de 500 cmc. Y ajouter 50 cmc. d'eau « distillée et XX gouttes d'acide acétique. Agiter. Addi- « tionner le mélange de 50 cmc. de ferrocyanure de « potassium à 15 %. Mélanger. Ajouter ensuite 50 cmc. « de solution d'acétate de zinc à 112 %.

« Mélanger énergiquement, compléter à 500 cmc. Agi- « ter vivement et longuement. Filtrer. » On obtient d'em- blée un liquide limpide et incolore, que l'on extrait à l'éther.

Un tel procédé présente l'inconvénient : 1° de nécessiter un sang à l'état liquide et non coagulé ; 2° de comprendre une défécation qui amène un précipité très volumineux pouvant à coup sûr retenir des dérivés barbituriques ; 3° d'obliger à pratiquer l'extraction sur un volume de solution aqueuse considérable, nécessitant l'emploi de grands volumes d'éther.

b) Recherche du véronal dans le lait.

M. Fabre [17 bis] vient de prouver que la muqueuse placentaire est parfaitement perméable au véronal et il a constaté le passage de cet hypnotique de la mère au fœtus. Considérant que la recherche du véronal dans le lait pouvait présenter un intérêt toxicologique et pharmacologique, nous avons effectué quelques essais dans ce sens.

Nous avons pensé qu'en traitant le lait par la liqueur d'Adam, utilisée pour le dosage du beurre dans le lait, nous obtiendrions le véronal dans la liqueur aqueuse ammoniacale après séparation des matières grasses. Cette solution aqueuse devait ensuite être privée de la caséine qu'elle contient. Pour cela elle était acidifiée par l'acide tartrique et additionnée d'un grand volume d'acétone. Malheureusement le précipité de caséine formé dans ces conditions est gélatineux et rend la filtration difficile. De plus la constatation d'une altération du véronal en milieu alcalin nous a fait renoncer à cette méthode.

Nous avons alors appliqué directement au lait la technique utilisée pour le sang et les viscères. Le lait, contenu dans un ballon, est acidifié par l'acide tartrique et additionné, par petites portions, de deux fois et demi son volume d'acétone. On chauffe pendant une heure au bain-marie, avec réfrigérant à reflux. Après refroidissement on filtre, lave le filtre avec un peu d'acétone, et on reçoit le filtrat dans une capsule. Etant donné les faibles quantités d'acétone employées il est inutile d'en envisager la récupération. On évapore donc au bain-marie pour chasser l'acétone et la liqueur aqueuse restante, étendue avec un peu d'eau, est additionnée de quelques grammes de sulfate d'ammonium. On chauffe quelques minutes encore au bain-marie, puis on laisse refroidir et on

filtre. La presque totalité du beurre reste sur le filtre ou dans la capsule. La solution aqueuse est alors concentrée à consistance sirupeuse et le résidu est repris par l'acétone. Cette solution acétonique, filtrée après refroidissement, est distillée. Sur le résidu encore chaud on verse de l'eau distillée en agitant vivement. On sature à chaud par le sulfate d'ammonium, on laisse refroidir et on filtre sur un filtre mouillé. Le filtrat, dont on vérifie la réaction acide, est épuisé à trois reprises par l'éther. Les liqueurs éthérées, réunies dans une ampoule à décantation, sont lavées avec une petite quantité d'eau pour éliminer les sels minéraux qui ont pu être entraînés, puis distillées jusqu'à siccité. Le résidu est dissous dans une petite quantité d'éther anhydre et soumis directement à la microsublimation dans les conditions que nous avons indiquées. Le produit sublimé est ensuite pesé à la microbalance. Dans tous les cas cette méthode nous a donné de très bons résultats et nous a fourni un véronal sublimé bien cristallisé.

Première expérience.

A 50 cmc. de lait de vache nous avons ajouté 1 cmc. de solution aqueuse de véronal à 0 gr. 10 %, ce qui correspond à 1 mgr. d'hypnotique ; après quelques heures de contact à la température du laboratoire nous avons pratiqué l'extraction suivant la technique indiquée ci-dessus.

Véronal trouvé : 0 mgr. 84.

Rendement : 84 %.

Deuxième expérience.

50 cmc. de lait de vache ont été additionnés de 0 cmc. 50 de solution de véronal à 0 gr. 10 % (0 mgr. 5).

Véronal trouvé : 0 mgr. 46.

Rendement : 92 %.

Troisième expérience.

20 cmc. de lait de femme additionnés de 1 cmc. de solution de véronal à 0,01 %, soit un dixième de mgr.

Véronal trouvé : 0 mgr. 07.

Rendement : 70 %.

PASSAGE DU VÉRONAL DANS LE LAIT CHEZ LA FEMME
EN PÉRIODE DE LACTATION.

Nous avons eu l'occasion de pratiquer cette recherche grâce à l'obligeance de M. le Professeur agrégé Ecalle, médecin de la Maternité de l'hôpital Boucicaut.

A une femme ayant absorbé 0 gr. 50 de véronal, sous forme de cachet, il a été prélevé, 12 heures après, 30 cmc. de lait sur lequel on pratique l'extraction du véronal suivant la méthode indiquée plus haut.

Véronal trouvé : 0 mgr. 22.

Véronal pour 1.000 cmc. de lait : 7 mgr. 3.

Cette expérience montre que le lait des nourrices, après ingestion de véronal, contient des doses non négligeables de cet hypnotique.

CHAPITRE VII

Application de la méthode à l'acétone à la recherche de la strychnine dans les viscères.

Parmi les alcaloïdes susceptibles de faire l'objet de recherches toxicologiques, nous avons limité à la strychnine nos essais de la méthode à l'acétone. Pour cela dans diverses expériences, effectuées en vue de l'extraction des barbituriques, nous avons ajouté aux viscères des doses connues de sulfate de strychnine. Après élimination des barbituriques, par agitation à l'éther en milieu acide, la solution aqueuse provenant du traitement des organes, suivant la technique indiquée plus haut, était alcalinisée par l'ammoniaque en présence de son volume d'éther. Par une vive agitation des deux liquides on assurait la dissolution de la strychnine, malgré sa faible solubilité dans ces conditions. L'extraction était complétée par deux nouveaux épuisements à l'éther et par deux autres au chloroforme. Dans tous les cas où nous avons pratiqué l'épuisement au chloroforme des liqueurs aqueuses provenant, soit de la technique d'Ogier, soit de la méthode à l'acétone, nous avons observé que le résidu laissé par l'évaporation du chloroforme était fortement impur.

PURIFICATION.

Les résidus, laissés par la distillation de l'éther et du chloroforme, ont été réunis et repris par l'eau acidulée à l'acide chlorhydrique, en chauffant doucement au bain-

marie. Après refroidissement, les solutions acides, filtrées sur un petit tampon de coton, sont introduites dans une ampoule à décantation. La solution est agitée avec trois portions d'éther pour assurer sa purification, puis alcalinisée par l'ammoniaque en présence de chloroforme. L'épuisement par ce solvant est répété trois fois ; les liqueurs chloroformiques sont filtrées sur un filtre sec, et abandonnées à l'évaporation dans un cristalliseur. De cette manière, nous avons toujours obtenu des résidus alcaloïdiques incolores et cristallisés.

a) Expériences sur des organes additionnés de strychnine.

Première expérience. — Dans un ballon contenant 30 mgr. de sulfate de strychnine dissous dans 30 cmc. d'eau distillée on introduit 100 gr. de foie de bœuf haché. On agite vigoureusement pour réaliser le mélange et on abandonne deux heures à la température du laboratoire.

L'extraction, pratiquée suivant la méthode décrite, et, après purification, comme il est dit ci-dessus, fournit :

9,7 mgr. de strychnine base, correspondant à :

24,8 mgr. de sulfate de strychnine cristallisé.

Rendement : 82,6 %.

Deuxième expérience. — Dans les mêmes conditions que dans l'expérience précédente, en opérant sur 100 gr. de foie de bœuf putréfié, additionné de 30 mgr. de sulfate de strychnine, nous avons obtenu :

9,2 mgr. de strychnine base, correspondant à :

23,5 mgr. de sulfate de strychnine cristallisé.

Rendement : 78,3 %

Nous avons effectué, à titre de comparaison, deux extractions par la méthode classique de Ogier-Kohn-Abrest.

Voici les résultats obtenus :

Première expérience : foie de bœuf : 100 gr. additionné de 30 mgr. de sulfate de strychnine.

Trouvé : 10 mgr. de strychnine base ; soit :
25 mgr. 6 de sulfate de strychnine cristallisé.
Rendement : 85,3 %.

Deuxième expérience : foie de bœuf putréfié : 100 gr. additionnés de 30 mgr. de sulfate de strychnine.

Trouvé : 8 mgr. 4 de strychnine base, soit : 21 mgr. 5 de sulfate de strychnine cristallisé.
Rendement : 71,6 %.

Ces résultats peuvent se résumer dans le tableau suivant :

EXTRACTION DE LA STRYCHNINE DES VISCÈRES

Procédé	Rendement	
	Foie frais	Foie putréfié
Classique	85,3	71,6
A l'acétone	82,6	78,3

Nous voyons par les résultats inscrits dans ce tableau que la méthode à l'acétone réussit au moins aussi bien que la méthode classique pour l'extraction de la strychnine des viscères. Elle paraît même donner des rendements plus satisfaisants dans le cas de viscères putréfiés : nous pensons que cela tient à la suppression des émulsions et à la simplification des manipulations.

b) Etude de la localisation de la strychnine chez l'animal ayant subi l'intoxication véronal-strychnine.

Les bons résultats obtenus dans la recherche de la strychnine au cours des expériences *in vitro* que nous venons de relater, nous ont encouragé à pratiquer l'extraction de la strychnine des viscères de l'animal qui

nous a servi à l'étude de la localisation du véronal. Rappelons que cette chienne avait reçu, par voie sous-cutanée, 100 mgr. de sulfate de strychnine en 4 injections espacées de 12 heures à 17 h. 30. Cette dose considérable, pour une chienne de 11 kgr. 600, a été nécessaire pour provoquer la mort, par suite de l'action antagoniste du véronal, qui était administré simultanément par voie digestive.

L'extraction de la strychnine et sa purification ont eu lieu suivant la méthode décrite plus haut, lors des expériences *in vitro*. Dans ce cas également elle succédait à l'extraction du dérivé barbiturique. Les quantités de strychnine extraites étant généralement très minimes, nous avons dû, pour leur évaluation, utiliser une micro-méthode de dosage colorimétrique. Le procédé employé nous a paru d'une précision suffisante et d'un emploi facile pour le but que nous poursuivions. Cette méthode, due à François [26], repose sur la réaction bien connue et très sensible de Malaquin-Denigès. Voici la technique décrite par l'auteur :

« On commence par préparer une solution étalon
« titrant exactement 9 mgr. de strychnine pour 1.000 cmc.
« Il suffit pour cela de diluer à 100 cmc. 1 cmc. 8 d'une
« solution à 60 cgr. de strychnine pour 1.000 cmc. Si l'on
« possède une solution de sulfate de strychnine officinal
« à 50 cgr. pour 1.000 cmc. il suffira d'en diluer 2, cmc. 3
« avec suffisamment d'eau distillée pour obtenir un volume
« final de 100 cmc.

« On amène la solution à doser, par une dilution convenable, à un titre voisin de 8 mgr. de strychnine pour
« 1.000 cmc.

PRATIQUE DU DOSAGE.

« Dans un tube à essai on met 4 cmc. de la solution à
« titrer (diluée convenablement), autant d'acide chlorhy-

« drique pur et 2 ou 3 gr. de zinc amalgamé. Dans un
« deuxième tube on met 4 cmc. de la solution étalon,
« 4 cmc. d'acide chlorhydrique pur et 2 ou 3 gr. de zinc
« amalgamé comme plus haut.

« On porte le contenu des 2 tubes à l'ébullition et on
« laisse la réduction s'effectuer pendant 4 à 5 minutes. Au
« bout de ce temps, on décante le liquide de chaque tube
« dans des tubes aussi semblables que possible. Après
« refroidissement, on ajoute dans chaque tube une goutte
« d'une solution d'azotite de sodium à 1 gr. pour 1.000 cmc.,
« on agite et on compare au bout d'une demi-minute les
« intensités de coloration obtenues ».

Pour le dosage que nous avons à effectuer, nous avons
préparé une solution étalon à 30 mgr. de strychnine
pour 1000 qui correspondait mieux aux concentrations
que nous avons à évaluer. Nous avons vérifié que les
colorations demeuraient proportionnelles pour de telles
concentrations. Les résidus que nous avons extraits des
viscères ont été repris par l'eau acidulée à l'acide chlor-
hydrique, transvasés dans un ballon jaugé et amenés à
un volume déterminé. La comparaison des teintes obte-
nues a été effectuée au colorimètre de Dubosq. Voici les
résultats de cette expérience :

Organe	Poids de l'or- gane prélevé en gr.	Poids de stry- chnine en mgr.	Evaluation en mgr. de sulfate
Cerveau	75	1,02	2,61
Cœur et sang.....	250	0,57	1,46
Poumons	115	0,23	0,58
Tube digestif.....	520	0,13	0,33
Foie	390	2,30	5,88
Pancréas	30	0,21	0,54
Rate	50	0,12	0,30
Reins	72	0,54	1,38

Le poids total des viscères analysés était de 1.502 gr.

La quantité de sulfate de strychnine retrouvée est au total de 13 mgr.

RECHERCHE DE LA STRYCHNINE DANS LE CAS DE MALADES INTOXIQUÉS
PAR LES BARBITURIQUES ET TRAITÉS PAR CE MÉDICAMENT.

Nous avons pu caractériser la strychnine, dans quelques cas, sur les solutions aqueuses résiduelles des extractions de barbituriques du sang de malades intoxiqués qui étaient traités par des injections de hautes doses de cet alcaloïde. Pour ces recherches nous avons utilisé, d'une part, la réaction bien connue bichromate et acide sulfurique. d'autre part, la réaction de Mandelin. Pour cette dernière, nous avons suivi les indications préconisées par Rossi [62] qui la rendent particulièrement sensible. Dans le sang du malade cité dans le cas n° 1, le résidu de l'éther alcalin, après purification, a montré la présence de traces de strychnine. Pour le cas n° 3 la réaction est nettement positive. Enfin, nous avons pu également pratiquer cette réaction sur le résidu de l'éther alcalin provenant de l'extraction de la thyroïde (cas n° 4) d'un malade intoxiqué par le gardénal et traité sans succès par des injections de strychnine, la réaction a été positive.

Conclusions

Nous avons effectué, au cours de notre travail, une étude critique des diverses méthodes d'extraction des poisons organiques fixes, spécialement au point de vue de leur application à la recherche des dérivés barbituriques, recherche qui offre actuellement un grand intérêt.

Nous avons mis en évidence l'importance, au point de vue de la toxicologie, des altérations subies par ces dérivés en milieu alcalin. Nous avons étudié les meilleurs procédés de purification proposés pour les barbituriques extraits des milieux biologiques, et, parmi ceux-ci, nous avons donné la préférence à une méthode utilisant la décoloration au noir et la microsublimation dans les conditions que nous avons précisées.

Pour l'identification des barbituriques extraits, nous avons pratiqué diverses réactions classiques et nous y avons ajouté un procédé personnel, par fusion alcaline, qui donne avec le gardénal et les produits voisins, une réaction très sensible.

Divers essais pratiqués avec la méthode de Stas-Otto-Ogier nous ont montré les difficultés que présente cette méthode classique, destinée en principe à la recherche des alcaloïdes, dans le cas des barbituriques.

Expérimentant les techniques décrites en ces dernières années, nous avons signalé les inconvénients présentés

par la méthode de Florence, à l'acide trichloracétique, et les résultats très frappants fournis par les méthodes opérant la dissolution des organes par action de ferments digestifs.

La méthode de M. Fabre, à la pancréatine, nous a paru devoir être retenue pour les recherches toxicologiques et biologiques.

Pour éviter les divers inconvénients observés dans la méthode de Stas-Otto, en particulier les émulsions, nous avons imaginé de substituer l'acétone à l'alcool, comme solvant, dans ce procédé et nous avons décrit, sur ce principe, une technique qui nous a donné des résultats très intéressants.

Nous avons appliqué cette technique à diverses recherches expérimentales et à l'analyse des organes d'un animal intoxiqué. Dans tous les cas l'extraction des barbituriques s'est faite, par cette méthode, dans de bien meilleures conditions qu'avec la méthode classique.

La sensibilité de notre méthode d'extraction à l'acétone nous a permis de rechercher les barbituriques dans des organes et produits n'en contenant que des traces. C'est ainsi que nous avons pu les caractériser dans les thyroïdes et les surrénales d'animaux et de malades intoxiqués et que, d'autre part, nous avons pu déceler le véronal dans le lait d'une nourrice ayant absorbé 0 gr. 50 de ce médicament.

Dans le but de faciliter la recherche des dérivés barbituriques dans le sang de malades ayant absorbé de fortes doses de ce toxique, nous avons décrit une méthode rapide qui permet, en quelques heures, d'isoler un produit assez pur pour être caractérisé.

La méthode à l'acétone paraît susceptible de généralisation et nous avons réussi, par son emploi, à retrouver la strychnine dans des viscères et dans les organes d'un animal intoxiqué.

* * *

Cette thèse a pu être réalisée grâce à la bourse de la « Fondation B. M. Devoto » que l'Académie de Médecine de Buenos-Ayres nous a accordée, à l'unanimité des voix, rendant ainsi possible notre si profitable séjour à Paris.

Vu : le Président de la thèse,
TASSILLY.

Vu : le Doyen de la Faculté,
PAUL GUÉRIN.

Vu et permis d'imprimer :
le Recteur de l'Académie de Paris,
S. CHARLÉTY.

BIBLIOGRAPHIE

1. *Autenrieth (G.)*. — Reconocimiento de venenos y medicamentos, 1908.
2. *Bodendorf (K.)*. — Arch. der Pharm., 1932, 270, 290.
3. *Brulé (M.)*. — Siècle médical, 10 nov. 1933.
4. *Brunning (A.) et Kraft (B.)*. — Arch. der Pharm., 1928, 256, 712.
5. *Cheramy (P.) et Lagarce (F.)*. — Journ. Pharm. et Chim., 1930 (8^e), 12, 366.
6. *Cheramy (P.) et Lobo (R.)*. — Communication présentée à la séance de la Soc. de Pharm. du 4 oct. 1933.
7. *Coronedi (G.)*. — Diagnosi e terapia clinica degli avvelenamenti, 1926.
8. *Denigès (G.)*. — Bull. Soc. Pharm. Bordeaux, 1928, 67, 165.
9. *Desodt (Ch.)*. — Les Barbituriques. Leur toxicologie. Th. Doct. Pharm., Nancy, 1933.
10. *Dragendorf (G.)*. — Die gerichtlich-chemische Ermittlung von Giften, 1895.
11. *Eder (R.) et Haas (W.)*. — Microchemie, Emich-Festschrift, 1930, p. 43.
12. *Ehrismann (O.) et Joachimoglu (G.)*. — Biochem. Ztschr., 1928, 199, 272.
13. *Erdmann et Uslar*. — Lieb. Am., 1861, 120, 121 et 360.
14. *Fabre (R.)*. — Bull. Sc. Pharmacol., 1925, 32, 279.
15. *Fabre (R.)*. — Communication présentée à la Soc. de Pharm. Séance du 3 mai 1933.
16. *Fabre (R.)*. — Journ. Pharm. et Chim., 1923 (7^e), 27, 337.
17. *Fabre (R.)*. — Journ. Pharm. et Chim., 1922 (7^e), 26, 241.

- 17 bis. *Fabre (R.)*. — Journ. Pharm. et Chim., 1933 (8^e), 18, 417.
18. *Fabre (R.) et Fredet (P.)*. — Journ. Pharm. et Chim., 1925 (8^e), 2, 321.
19. *Flandin (Ch.) et Bernard (J.)*. — Soc. Méd. Hôpitaux, 1^{er} déc. 1933.
20. *Fischer (R.)*. — Microchemie, 1932, 9, 409.
21. *Fischer (R.)*. — Pharm. Monatsch., 1927, 8, 195.
22. *Fischer (R.) et Kofler (A.)*. — Arch. der Pharm., 1932, 270, 207.
23. *Fleury (P.)*. — Journ. Pharm. et Chim., 1925 (8^e), 2, 465.
24. *Fleury et Guinnebault*. — C. R. Soc. Biol., 1925, 93, 1508.
25. *Florence (G.)*. — Bull. Soc. Chim., 1927 (4^e), 41 ; 1097 et 1242.
26. *François (A.)*. — Bull. Soc. Pharm. Bordeaux, 1930, 68, 158.
27. *Frerichs (G. et H.)*. — Arch. der Pharm., 1906, 244, 86.
28. *Gadamer (J.)*. — Lehrbuch der chemischen Toxicologie und Anleitung zur Ermittlung der Gifte, 1924.
29. *Hilger (A.), Kuster (P.) et Jansen (K.)*. — Forschungsberichte über Lebensmittel, 1895, 1, 14.
30. *Joanid (N.D.)*. — Bull. Soc. Chim. Biol., 1930, 7, 1001.
31. *Jorissen*. — Journ. Pharm. et Chim., 1910 (7^e), 3, 478.
32. *Kaiser (H.)*. — Süddeutsche Apoth. Zeitg., 1932, 72, 57 et 65.
33. *Keeser (E. et I.)*. — Arch. für exp. Path. und Pharmakol., 1927, 125, 251.
34. *Keeser (E. et I.)*. — Arch. für exp. Path. und Pharmacol., 1927, 127, 230.
35. *Kempf (R.)*. — Zeitschr. für anal. Chem., 1923, 62, 284.
36. *Klein (G.) et Werner (O.)*. — Zeitschr. Physiol. Chem. 1925, 143, 143.
37. *Koenig (W.) et Kluge (H.)*. — Chem. Ztg., 1930, 54, 451.
38. *Kohn-Abrest*. — Ann. Fals., 1913, 6, 131.
39. *Kohn-Abrest, Capus, Desoille et Villard*. — C. R. Ac. Sc., 1930, 190, 281.
40. *Koll (W.)*. — Arch. für exp. Path. und. Pharmakol., 1931, 162, 320.

41. *Kuhn (A.)*. — Deut. Ztg. grs. gerichtl. Med., 1929, **13**, 115.
42. *Lagarce (F.)*. — Journ. Pharm. et Chim., 1930 (8^e), **12**, 364.
43. *Lagarce (F.)*. — Contribution à la toxicologie des dérivés barbituriques. Th. Doct. Pharm. Paris. 1930.
44. *Lebeau et Courtois (G.)*. — Traité de Pharmacie chimique, 1929.
45. *Le Guillant (L.)*. — La toxicomanie barbiturique, Paris, 1930.
46. *Magnin (J.)*. — Journ. Pharm. et Chim., 1927 (8^e), **5**, 316.
47. *Mameli (E.)*. — Chimica Tossicologica, 1927.
48. *Mayrhofer (A.)*. — Mikrochemie d. Arzneien u. Gifte, 1923.
49. *Molle et Kleist*. — Arch. der Pharm., 1904, **242**, 401.
50. *Nolte (E.)*. — Pharm. Zeitung, 1920, **65**, 320.
51. *Ogier (J.) et Kohn-Abrest*. — Chimie toxicologique, 1924.
52. *Otto (F. J.)*. — Lieb. Ann, 1856, **100**, 44.
53. *Paget et Desodt*. — Journ. Pharm. et Chim., 1933 (8^e), **18**, 207.
54. *Paget et Desodt*. — Bull. Sc. Pharmacol., 1932, **39**, 532.
55. *Panzer*. — Atti VI^e Congresso interno Chim. appl. Roma, 1906, **5**, 188.
56. *Parri (W.)*. — Boll. chim. farm., 1924, **63**, 401.
57. *Piettre et Vila*. — C. R. Ac. Sc., 1920, **170**, 1466.
58. *Piettre et Vila*. — C. R. Ac. Sc., 1920, **171**, 372.
59. *Piettre*. — C. R. Ac. Sc., 1929, **189**, 1034.
60. *Ramond (L.)*. — Presse médicale, 30 sept. 1933, n^o 78, 1507.
61. *Ranwez (F.)*. — Journ. Pharm. Belg., 1924, **6**, 410 et 501.
62. *Rossi (L.)*. — Semana Médica, 1925, **32**, 1201.
63. *Sabalitschka (T.)*. — Análisis Químico-toxicológico, 1926.
64. *Schoofs*. — Bull. Ac. roy. med. Belg., 1924 (5^e), **4**, 303.
65. *Schoofs*. — Bull. Ac. roy. med. Belg., 1925 (5^e), **5**, 570.
66. *Schoofs*. — Bull. Ac. roy. med. Belg., 1926 (5^e), **6**, 429.

67. *Schoofs*. — Bull. Ac. roy. med. Belg., 1927 (5^e), 7, 832.
 68. *Selmi*. — Gazz. Chim. Ital., 1876, 6, 32.
 69. *Senkowsky*. — Zeitschr. für anal. Chem., 1898, 37, 359.
 70. *Sensi (G.)*. — Ann. Chim. applicata, 1926, 16, 510.
 71. *Shoule (H. A.), Keltch (A. K.), Kempf (G. F.) et Swanson*. — The Journ. of Pharmacol. and Exp. Therap., 1933, 49, 393.
 72. *Stas (J. S.)*. — Bull. Ac. med. Belg., 1850, 2, 304.
 73. *Strzyzowski (C.)*. — Ann. de Méd. légale, 1933, 13, 49.
 74. *Tagliarini (A.)*. — Boll. chim. farm., 1906, 45, 106.
 75. *Tardieu (A.)*. — Th. Doct. méd. Paris, 1924.
 76. *Tardieu (A.) et Camps (S.)*. — Soc. de Thérap., 13 nov. 1924.
 77. *Tardieu (A.) et Medioni (A.)*. — Journ. de Méd. de Paris, n° 17, 1924.
 78. *Tunmann (O.)*. — Apoth. Zeit., 1917, 32, 289.
 79. *Van Itallie (L.) et Steenhauer (A. J.)*. — Pharm. Weekblad, 1921, 58, 1062.
 80. *Van Itallie (L.) et Steenhauer (A. J.)*. — Pharm. Weekblad, 1929, 66, 14.
 81. *Van Rijn (E. A.)*. — Pharm. Weekblad, 1928, 65, 1030.
 82. *Velluz (L.)*. — Bull. Soc. Chim. Biol., 1926, 8, 751.
 83. *Venturoli*. — Apoth. Zeit., 1914, 29, 250.
 84. *Vitte*. — Bull. Soc. Pharm. Bordeaux, 1931, 69, 279.
 85. *Weiss (E.)*. — Pharm. Zentr., 1931, 72, 433.
 - 85 (bis). *Weiss (S.) et Hatcher (R. A.)*. — Journ. of. Pharmacol. and exp. Ther., 1922, 19, 459.
 86. *Werner (E. A.)*. — Analyst, 1933, 58, 335.
 87. *Zwikker (J. J. L.)*. — Pharm. Weekblad, 1931, 68, 975.
-

TABLE DES MATIÈRES

	Pages
INTRODUCTION.....	9
CHAPITRE I. — <i>Généralités sur les méthodes utilisées en toxicologie pour les poisons organiques.....</i>	12
CHAPITRE II. — <i>Etude des dérivés barbituriques au point de vue toxicologique.....</i>	19
<i>a) Revue sommaire des propriétés toxiques.....</i>	20
<i>b) Principales propriétés physiques et chimiques.....</i>	24
<i>c) Altération des dérivés barbituriques en milieu alcalin.....</i>	25
<i>d) Procédés de purification des barbituriques.....</i>	29
CHAPITRE III. — <i>Méthodes d'extraction des barbituriques des viscères.....</i>	47
<i>a) Méthode d'Ogier-Kohn-Abrest.....</i>	47
<i>b) Méthode à l'acide trichloracétique.....</i>	54
<i>c) Méthodes par protéolyse.....</i>	59
CHAPITRE IV. — <i>Technique d'extraction proposée.....</i>	66
<i>a) Emploi de l'acétone.....</i>	66
<i>b) Description de la technique.....</i>	67
CHAPITRE V. — <i>Résultats fournis par la technique proposée.....</i>	80
<i>a) In vitro sur des viscères additionnés de toxiques ..</i>	80
<i>b) Application de la méthode à l'acétone à la recherche des barbituriques chez des toxiques.....</i>	84
<i>c) Application de la méthode à l'acétone à des expériences de toxicologie animale.....</i>	89
CHAPITRE VI. — <i>a) Méthode rapide pour la recherche des dérivés barbituriques dans le sang.....</i>	95
<i>b) Recherche du véronal dans le lait.....</i>	99
CHAPITRE VII. — <i>Application de la méthode à l'acétone à la recherche de la strychnine dans les viscères.....</i>	102
<i>a) Expériences sur des organes additionnés de strychnine.....</i>	103
<i>b) Etude de la localisation de la strychnine chez l'animal ayant subi l'intoxication véronal-strychnine..</i>	104
CONCLUSIONS.....	108

604. — Impr. de la Fac. de Méd., Jouve et Cie, 15, rue Racine, Paris. — 2-34.
